

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Die Charakterisierung der Funktion des Lipidtransporters ABCA3 in der Milchdrüse
(am Mausmodell)



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Maresa Schicker

aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. univ. Andreas Holzinger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Reinhart Zachoval
Priv. Doz. Dr. Annette Pohl-Kappe

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer.nat. Markus Hammel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2014

Abstract

ABCA3 ist als Phospholipidtransporter der ABC-Transporterfamilie wesentlich an der Synthese von Lungensurfactant beteiligt. Diese wichtige Rolle von ABCA3 in der Lunge ist mittlerweile bekannt und wird weiterhin näher erforscht. Des Weiteren wird ABCA3 auch in anderen Geweben exprimiert, darunter Leber, Niere, Gehirn [Stahlman et al. 2007]. ABCA3 wurde daneben auch in humanem Milchdrüsengewebe entdeckt und stellt in Mammakarzinomen einen Marker für eine gute Prognose dar [Schimanski 2010].

In der murinen Milchdrüse ist die *Abca3*-Expression molekularbiologisch auf Ebene der mRNA nachgewiesen worden [Hammel 2007]. Des Weiteren ist ABCA3 in immunhistochemischen Färbungen von humaner und muriner Milch darstellbar. Dort ist es auf der Außenseite der Milchfetttröpfchen-Membran lokalisiert [bislang nicht veröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe]. Milchfetttröpfchen werden in Milchdrüsen-Epithelzellen gebildet, indem Lipidtransporter (unter anderem ABC-Transporter der ABCA-Subklasse wie ABCA1 oder ABCA7) Lipide importieren.

In der Milchdrüse ist über den Mechanismus, mit dem ABCA3 an der Milchsekretion beteiligt sein könnte, nicht viel bekannt. Es kann aber analog zu der Rolle in der Lunge davon ausgegangen werden, dass ABCA3 auch in der Milchdrüse Phospholipide transportiert. Phospholipide verfügen über wichtige Eigenschaften in der Milch als Emulgatoren und als protektive Faktoren für das Neugeborene. Es ist nachgewiesen, dass ein Einschnitt in der Phospholipid-Sekretion und eine veränderte Zusammensetzung der Phospholipide in der Milch zu nachteiligen Auswirkungen auf das Neugeborene führen [Isaacs 2005].

Es stellt sich die Frage, ob und inwieweit ABCA3 in der Brustdrüse an der Milchbildung und –sekretion beteiligt ist.

Dazu wurde ein Mausmodell mit spezifischer Deletion des ABCA3 Gens in der Milchdrüse generiert. Eine Mauslinie mit Cre-Expression unter dem während der Laktation spezifisch im Mammagewebe aktiven Lactoglobulin-Promotor wurde mit einer Mauslinie gekreuzt, welche im ABCA3-Gen LoxP Stellen enthielt. Es kommt zur Cre-getriggerten Deletion von ABCA3 im Mammagewebe. Das andere Allel wurde durch Einkreuzen einer klassischen Knockout-Linie gänzlich inaktiviert. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR. Zur quantitativen Bestimmung der Expression von *Abca3* im Mammagewebe wurde die Methode der quantitativen RT-PCR angewendet.

Der Melkvorgang erfolgte mittels einer eigens konzipierten Melkvorrichtung. Diese beinhaltet eine Flüssigkeitsfalle, wodurch ein besseres Handling beim Melkvorgang erreicht wurde. So konnte unter anderem eine höhere Milchmenge pro Maus gewonnen werden mit weniger technisch bedingten Schwankungen. Die Milchproben an Tag 5, 10 und 15 der Laktation wurden massenspektrometrisch auf den Gehalt der einzelnen Phospholipide analysiert.

Es ergab sich eine Reduktion des *Abca3*-Gens im Milchdrüsengewebe der geflochten Mäuse von 95% im Vergleich zum Wildtyp. Die Analyse der Phospholipide zeigte eine Verminderung von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin, während innerhalb der Phosphatidylcholin-Spezies kurzkettige Moleküle (PC30:0, PC32:0) signifikant vermindert waren. Die Milchmenge der ABCA3 defizienten Linie an Tag 15 der Laktation war signifikant vermindert im Vergleich zur Wildtyp Gruppe ($p = 0,005$).

Der Nachweis von ABCA3 in Milchfetttröpfchen und die Verminderung der Milchmenge bei dessen Fehlen weist auf eine Rolle dieses Transporters für die Milchsekretion hin. Da Phospholipide nur einen geringen Anteil der Milchfette darstellen, aber vor allem in der Membran der Milchfetttröpfchen enthalten sind, könnte ABCA3 möglicherweise durch Bereitstellung von Phospholipiden für die Bildung der Membran von Milchfetttröpfchen an der Milchbildung beteiligt sein. Am Höhepunkt der Laktation kann das Phospholipid-Defizit in den Milchfetttröpfchen nicht mehr kompensiert werden und die Milchmenge nimmt durch die verminderte Bildung von Milchfetttröpfchen signifikant ab. Dabei ändert sich die Gesamtzusammensetzung der Milch nur unbedeutend, da jeweils das gesamte Organell „Milchfetttröpfchen“ mitsamt Inhalt fehlt. Dies muss im Rahmen dieser Studie allerdings hypothetisch bleiben.

Die Charakterisierung der Funktion
des Lipidtransporters ABCA3
in der Milchdrüse

(am Mausmodell)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Die Milchdrüse	6
1.1.1. Entwicklung und Aufbau der Milchdrüse.....	8
1.1.2. Mechanismen der Milchsekretion.....	10
1.1.3. Lipidsynthese und -sekretion	12
1.1.4. Milk Fat Globules und Phospholipide	12
1.2. ABC-Transporter	16
1.2.1. Struktur und Funktion	17
1.2.2. Assoziierte Krankheiten.....	19
1.2.3. Die ABCA-Subfamilie.....	20
1.3. ABCA3	21
1.3.1. Die Rolle von ABCA3 in der Lunge	21
1.3.2. Die Rolle von ABCA3 in der Milchdrüse	23
1.4. Mausmodell	24
1.4.1. Das <i>Cre-loxP</i> -System	24
1.4.2. Milchdrüsenspezifische Promoter.....	27
2. Zielsetzung	29
3. Methoden und Material	30
3.1. Tierexperimentelle Methoden.....	30
3.1.1. Mausezucht	30
3.1.2. Transgene Linien	31
3.1.3. Melken	33
3.1.3.1. Aufbau der Melkvorrichtung.....	34
3.1.3.2. Der Melkvorgang	35
3.1.4. Gewebeentnahme	37
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1. DNA-Extraktion.....	37

3.2.2.	RNA-Extraktion und reverse Transkription.....	39
3.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.2.4.	Gelelektrophorese	45
3.2.5.	Massenspektroskopie	46
3.3.	Statistische Methoden	46
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Konditionale Gendeletion von ABCA3 in der Milchdrüse	47
4.1.1.	Kreuzung der Mauslinien und Genotypisierung	47
4.1.2.	Flox-Nachweis mittels genomischer DNA	50
4.1.3.	Quantitative Bestimmung des Expressionslevels für ABCA3.....	52
4.1.4.	Quantitative Bestimmung der Expressionslevel weiterer Gene.....	53
4.2.	Optimierung des Melkvorgangs	54
4.3.	Mamma und Laktation	55
4.3.1.	Milchmenge	56
4.3.2.	Gewicht der Pups	59
4.4.	Lipidanalyse der Milch	61
4.4.1.	Cholesterin	61
4.4.2.	Phospholipidzusammensetzung der Mausmilch	62
4.4.2.1.	Vergleich der Phospholipide	63
4.4.2.2.	Vergleich der Phosphatidylcholin-Subspezies	65
5.	Diskussion	68
5.1.	Milchgewinnung durch Melken.....	68
5.2.	Konditionaler Knockout von <i>Abca3</i> im Mammagewebe	69
5.3.	Das <i>Cre-LoxP</i> -System unter dem oBLG-Promoter	70
5.4.	Milchmenge und Wurfgewicht.....	71
5.5.	Cholesterin.....	72
5.6.	Phospholipide	72
5.7.	Genregulation	73
5.8.	Weitere ABC-Transporter	75

6. Zusammenfassung	76
7. Anhang	78
7.1. Melkprotokoll	78
7.2. Datentabelle der Gesamt-Phospholipidauswertung	82
7.3. Datentabellen der Phosphatidycholinauswertung	84
7.4. Abkürzungsverzeichnis	93
7.5. Tabellenverzeichnis	95
7.6. Abbildungsverzeichnis	95
8. Literaturverzeichnis	97
9. Veröffentlichung	109
10. Danksagung	110

1. Einleitung

1.1. Die Milchdrüse

Die Milchdrüse ist ein sekretorisches Organ der Säugetiere, das während der Laktation Milch als die erste Nahrung der Neugeborenen produziert [Sternlicht 2006]. Bereitstellen von Nahrung für das Neugeborene ist aber nicht die einzige Funktion der Milchdrüse. Sie sorgt auch dafür, dass in der Milch eine Vielzahl von protektiven Faktoren enthalten sind, die das Neugeborene zum Beispiel vor Infektionen und anderen Krankheiten schützen und die regelrechte Entwicklung des gastrointestinalen Systems fördern. Zu diesen Schutzfaktoren zählen unter anderem Immunglobuline (IgA) sowie Proteine und Milchfette mit antimikrobiellen und mucosaprotektiven Eigenschaften [Isaacs 2005, Isaacs 2001, Hamosh 1999].

Das größte Feld der Forschung bezüglich der Milchdrüse zielt auf das bessere Verständnis und die Aufklärung der regulatorischen Mechanismen in Brustdrüsenepithelzellen ab. Dabei sind vor allem die Differenzierungsvorgänge der epithelialen Stammzellen und die nach der Laktation stattfindende Apoptose auf Ebene der Signaltransduktion sowie die Regulation dieser Vorgänge von Interesse. Ist diese Regulation gestört, kann es zur Entdifferenzierung und Entartung einzelner Zellen und damit zur Entstehung von Brustkrebs kommen [Li 2005].

Im Rahmen dieser Arbeit stehen die Mechanismen der Milchsekretion, vor allem die der Lipidsekretion, und die Rolle des ABC-Transporters ABCA3 in der Milchdrüsenepithelzelle im Vordergrund. Durch Ausknocken des ABCA3-Gens im Mausmodell und Gewinnung und Analyse von Mausmilch soll die Bedeutung dieses speziellen Lipidtransporters ABCA3 für die Milchbildung, -sekretion und -qualität näher erfasst werden. Daher wird in den folgenden Kapiteln vor allem auf die Mechanismen der Lipidsekretion und die Milchezusammensetzung in Bezug auf die verschiedenen (Phospho-) Lipidklassen eingegangen.

Es sei hier schon kurz erwähnt, dass seit kurzem ABCA3 auch für die Brustkrebsforschung interessant geworden ist. Höhere Expression von ABCA3 in Mammakarzinomen ist mit besserer Prognose assoziiert [Schimanski 2010] (siehe hierzu Kapitel 1.3.2).

Je nach Säugetierklasse variiert die Anzahl und Lokalisation der Brustdrüsen [Hennighausen 2005]. Mäuse haben fünf Drüsenpaare (siehe Abbildung 1.1-1), die sich zwischen Vorder- und Hinterläufen hintereinander verteilen. Beim Menschen dagegen befindet sich nur ein Drüsenpaar in der thorakalen Region.

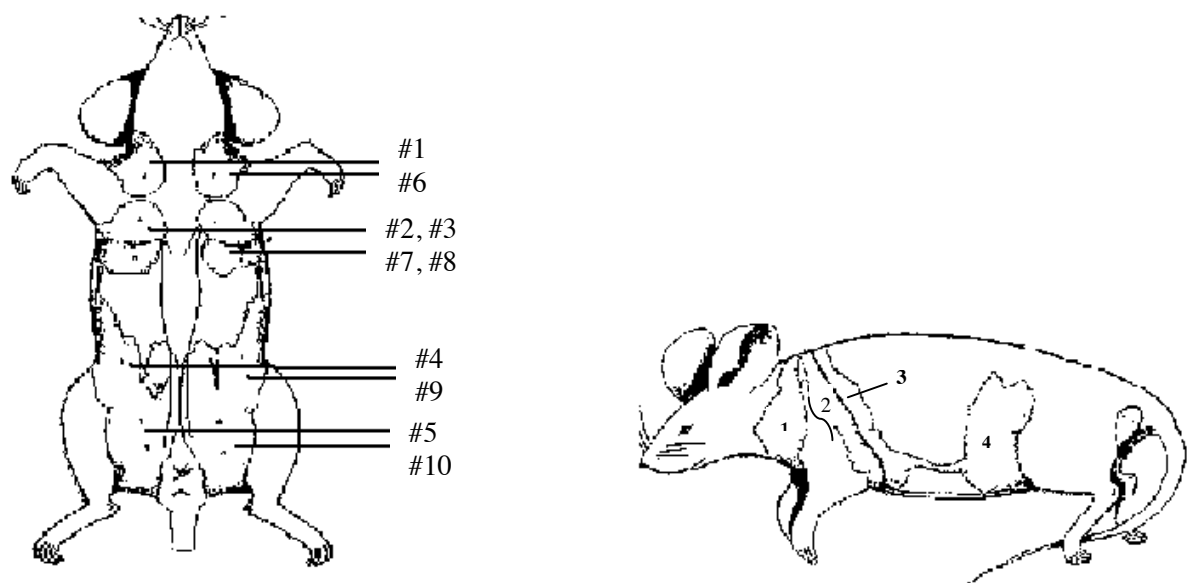


Abbildung 1.1-1: Lokalisation und Nummerierung der fünf Brustdrüsenpaare der Maus (#1, #6: zervikale Brustdrüsen; #2, #3, #7, #8: thorakale Brustdrüsen; #4, #9: abdominale Brustdrüsen; #5, #10: inguinale Brustdrüsen) [http://tvmouse.compmed.ucdavis.edu/bcancercd/22/index.html]

Unterschiede zwischen der Brustdrüse des Menschen und der Milchdrüse der Maus gibt es vor allem histologisch gesehen. Beim Menschen besteht die Brustdrüse aus 12 bis 20 Drüsenlappen, die in einem jeweils eigenen Ausführungsgang an der Oberfläche der Mamille enden. Die Lappen bestehen wiederum aus einem umfangreichen Gangsystem und Läppchen (Lobuli), die in ein straffes Bindegewebe eingebettet sind [Welsch 2006]. Bei der Maus dagegen findet sich nur ein gemeinsamer Ausführungsgang und die Drüsenstrukturen befinden sich in direkter Nachbarschaft zum Fettgewebe der Milchdrüse. Abbildung 1.1-2 zeigt einen Vergleich zwischen humaner und muriner Milchdrüse [Parmar 2004].

Dennoch besteht laut Parmar 2004 eine gute Vergleichbarkeit von menschlicher und muriner Milchdrüse in Studien. Die weiteren Ausführungen beziehen sich auf die Milchdrüse der Maus.

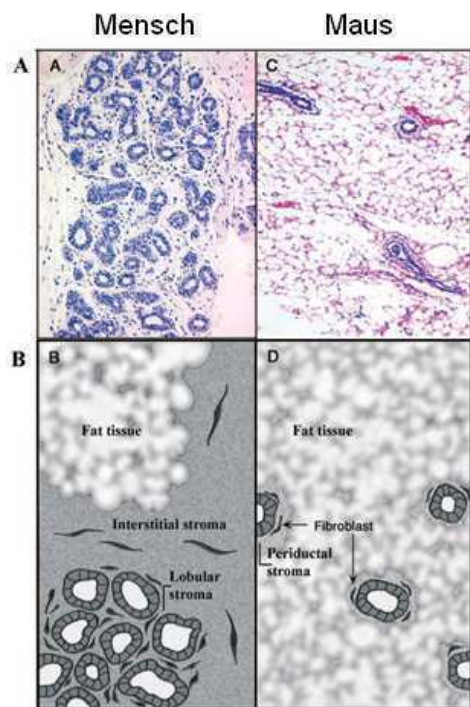


Abbildung 1.1-2: Vergleich menschlicher und muriner Brustdrüse. (A) Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung von menschlichem Brustdrüsengewebe. Die terminale lobular-alveoläre Einheit ist von fibrösem Bindegewebe umgeben. (B) Schematische Darstellung zu (A) mit Betonung auf die Nähe des Drüsenepithelgewebes zum interstitiellen fibrösen Bindegewebe und dem weiter entfernten Fettgewebe. (C) H&E Färbung der murinen Milchdrüse, deren Strukturen in das umliegende Binde- und Fettgewebe eingebettet sind. (D) Schematische Darstellung zu (C). [Parmar 2004, Ronnov-Jessen et al. 1996]

1.1.1. Entwicklung und Aufbau der Milchdrüse

Die Entwicklung der Milchdrüse beginnt im Embryonalstadium ausgehend von der Haut entlang der sogenannten Milchleiste. Evolutionstechnisch gesehen ist sie eine Hautanhangsdrüse. Es entsteht ein kleiner Gang von der Haut in das unterliegende Fettgewebe, der während der Pubertät unter dem Einfluss von Östrogenen [Feng 2007] und Progesteron weiter wächst und sich verzweigt. Das Wachstum erfolgt ausgehend von den zellreichen TEBs (terminal end buds), die am Ende der Drüsengänge liegen. Sie verschwinden, sobald das ganze Fettgewebe mit Drüsengängen und Azini gefüllt ist. [Parmar 2004]

Während der Schwangerschaft kommt es, angestoßen durch hormonelle Veränderungen (Prolaktinausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen), zu Umwandlungsvorgängen in der Milchdrüse auf zellulärer Ebene, nämlich zur Proliferation und Differenzierung der epithelialen Zellen zu reifen milchproduzierenden Laktozyten, angeordnet in dicht gepackten

Alveolen (Abbildung 1.1.1-1, d). An Tag 18 der Schwangerschaft produzieren die Epithelzellen Lipide und Milchproteine. An Tag 20 – 21 (kurz vor dem Zeitpunkt der Geburt an Tag 21) beginnt die Milchsekretion [Henninghausen 2005].

Die Laktation dauert circa drei Wochen [Richert 2000]. Am Ende der Laktation finden durch Wegfall des Stimulus der saugenden Nachkommen wieder hormonelle Umstellungen statt und es kommt zur Involution der Milchdrüse mittels Apoptose. Diese ähnelt dann wieder der Milchdrüse einer nulliparen geschlechtsreifen Maus (siehe Abbildung 1.1.1-1, b). Dieser Zyklus von Laktation und Involution wird mit jeder Schwangerschaft erneut durchlaufen. Ermöglicht wird dies unter anderem durch das Vorhandensein von Stammzellen des Mammagewebes und duktalem beziehungsweise epithelialen Progenitorzellen [Henninghausen 2005].

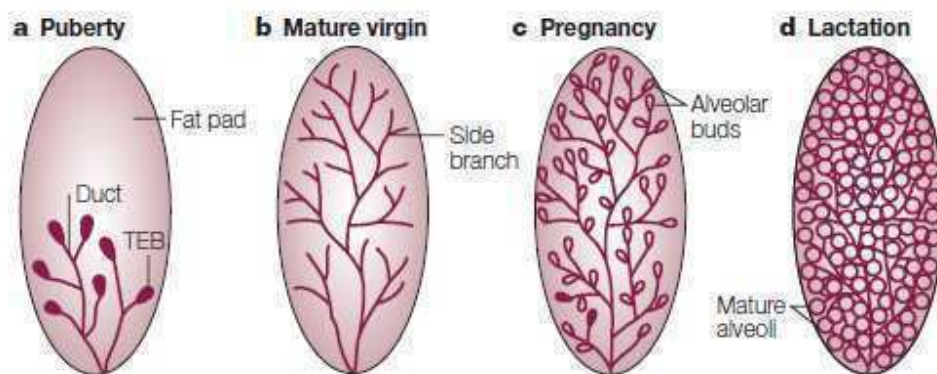


Abbildung 1.1.1-1: Stadien der Milchdrüsenentwicklung der Maus. a Pubertät: Ausgehend von den terminal end buds (TEB) wachsen die duktalem Strukturen in das Fettgewebe (Fat pad) ein. **b Milchdrüse einer geschlechtsreifen nulliparen Maus.** **c Schwangerschaft:** Proliferation der Milchdrüsenepithelzellen und Ausbildung von alveolären Endknospen (alveolar buds). **d Laktation:** Die Milchdrüse besteht aus dicht gepackten Alveolen. Das gesamte Epithel der Drüse sezerniert Milch. [Henninghausen 2005]

Von den Stammzellen des Mammagewebes geht noch eine weitere Zellart aus: die myoepitheliale Zelle. Diese Zellen bilden ein netzartiges System um die Epithelzellen herum. Sie sind in der Lage sich bei entsprechendem Signal zu kontrahieren und damit die Milch in Richtung Mamille zu treiben [Henninghausen 2005]. Das Hormon, das dieses Signal vermittelt, ist Oxytocin. Die Proliferation der milchbildenden Zellen und die Menge der sezernierten Milch wird durch Oxytocin nicht beeinflusst [Nishimori 1996].

Diese oben genannten Abläufe von Differenzierung, Proliferation und Involution unterliegen einer strengen, vor allem hormonellen Regulation. Deswegen sollen hier kurz die wichtigsten Hormone genannt werden, die Einfluss auf die Brustdrüse haben. Eine wichtige Gruppe stellen die reproduktiven Hormone dar. Dazu gehören Östrogen (E), Progesteron (P),

Plazentalactogen (PL), Prolactin (PRL) und Oxytocin, deren Level je nach reproduktivem Stadium schwanken. Diese Hormone haben einen direkten Einfluss auf die Brustdrüse. Insbesondere Prolaktin spielt eine wichtige Rolle für die Lipidsynthese [Rudolph 2011]. Aus der Gruppe der Stoffwechselformone spielt das Wachstumshormon (Growth hormone GH) eine Rolle in der Entwicklung der Drüsengänge. Glukokortikoide und Schilddrüsenhormone sind für die Milchsekretion notwendig. Sie regeln auch die Anpassung des gesamten Stoffwechsels während der Laktation. Außerdem ist die Brustdrüse in der Lage selbst Hormone mit autokrinen oder parakrinen Effekten zu bilden. [Neville 2002]

1.1.2. Mechanismen der Milchsekretion

Als sekretorisch hoch aktive Zelle besitzt die Milchdrüsenepithelzelle während der Laktation ein ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum, einen großen Golgiapparat und viele sekretorische Vesikel. Die Epithelzellen sind durch tight junctions eng miteinander verbunden. Diese bilden zusammen mit der Basalmembran und den Zellmembranen eine Barriere, die den direkten parazellulären Übertritt von Substanzen aus den Kapillaren in die Milch verhindern. McManaman et al. beschreiben fünf Wege auf denen Milchbestandteile in die Ausführungsgänge sezerniert werden können (siehe Abbildung 1.1.2-1, I - V).

In der Zelle hergestellte Substanzen einschließlich aller großen Milchproteine und Zucker, vor allem Lactose, werden mittels Exozytose ausgeschleust (I). Der Prozess der Lipidsekretion (Triglyceride, lipidassoziierte Proteine, Phospholipide) ist nicht vergleichbar mit der Lipidsekretion in anderen Zellen und findet so nur in Milchdrüsenepithelzellen statt (II). Da dieser Vorgang im murinen sowie humanen Organismus einzigartig ist und zudem vermutet wird, dass ABCA3 als Lipidtransporter hierbei eine Rolle spielt, wird die Lipidsynthese und Sekretion in Kapitel 1.1.3 gesondert beschrieben.

Serumproteine, wie zum Beispiel IgA, treten per Transzytose in die Milch über (III), während kleinere Moleküle (Ionen, Wasser, Glucose) durch verschiedene Membrantransporter in die Zelle aufgenommen und apikal wieder abgegeben werden (IV). Der parazelluläre Weg (V) ist während der Laktation in einer gesunden Milchdrüse durch tight junctions versperrt und spielt nur bei entzündlichen oder malignen Prozessen eine Rolle. [McManaman 2003]

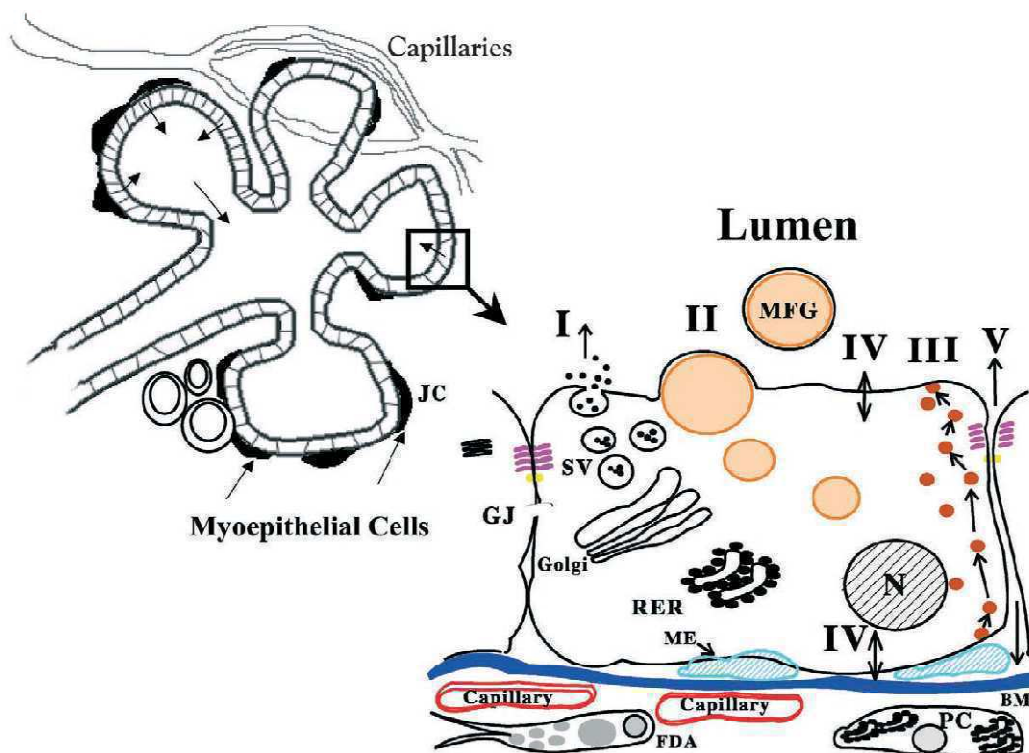


Abbildung 1.1.2-1: Schematische Zeichnung eines Alveolus und einer alveolären Epithelzelle mit Darstellung der verschiedenen Wege der Milchsekretion I - V. I: Exozytose von der Zelle gebildeter Substanzen, II: Lipidsekretion, III: Transzytose von Stoffen aus dem Blut, z.B. IgA, IV: Membrantransporter vermittelte Diffusion von Ionen, Glucose, Wasser, V: Parazellulärer Weg.

Pfeile: Richtung der Sekretion. MFG: Milk Fat Globule, SV: Sekretorisches Vesikel, RER: raues endoplasmatisches Reticulum, BM: Basalmembran, N:Nucleus, PC: Plasmazelle, FDA: fat depleted adipocyte, JC: junctionaler Komplex mit tight junctions, GJ: gap junction, ME: myoepitheliale Zelle [McManaman 2003]

Insgesamt ist Mausmilch aufgrund ihres großen Anteils an festen Bestandteilen sehr konzentriert, außerdem hat sie im Vergleich zum Menschen oder der Kuh einen hohen Fettanteil. Die grobe Zusammensetzung von Mausmilch ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Milch von C57/Bl6J Mäusen [Meier 1965]

Bestandteile	in %
Wasser	38,7
Feste Bestandteile	61,3
Lipide	41,6
Protein	14,1

1.1.3. Lipidsynthese und -sekretion

Die laktierende Milchdrüse ist eines der drei großen lipidsynthetisierenden Organe. Die anderen beiden sind Leber und Fettgewebe [Wakil 2008]. Milchfett besteht zu 98% aus Triacylglyceriden. Diese stammen entweder aus der Nahrung, von den Adipozyten der Milchdrüse oder aus der De-novo-Synthese der Milchdrüsenepithelzellen [Anderson 2007]. Während der Schwangerschaft steigt die Expression wichtiger Gene für die TAG-Synthese an und bleibt während der Laktation erhöht. Gene der beta-Oxidation sind herabreguliert, so dass alle Fettsäuren zur TAG-Synthese verwendet werden können. Dagegen werden Gene der Fettsäuresynthese zu Beginn der Laktation stark hochreguliert [Rudolph 2007]. Die Genregulation ist auch stark abhängig von der Menge und dem Fett- und Energiegehalt der Nahrung [Rudolph 2010].

Nach dem gängigen Modell werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) aus Fettsäuren und Glycerin neu synthetisierte Lipidmoleküle in sogenannten zytoplasmatischen Lipidtröpfchen (CLD cytoplasmatic lipid droplets) gespeichert [Heid 2005]. Diese sind von einer einschichtigen Membran (hervorgehend aus der des ER) aus polaren Lipiden und Proteinen umgeben [McManaman 2003]. Sie können miteinander und mit Fettsäuren aus der Nahrung oder aus Adipozyten zu größeren Tröpfchen fusionieren und werden dann an der apikalen Zellmembran in die Milchgänge abgegeben (siehe Abbildung 1.1.2-1 II). Dabei bleiben sie von der Zellmembran vollständig umschlossen. Die Zellmembran gelangt also als Membran der Lipidtröpfchen mit in die fertige Milch. Diese werden dann Milchfettkugeln (MFG milk fat globules) und ihre Membran Milchfettkugelmembran (MFGM milk fat globule membrane) genannt [Aoki 2006, Mather 2001, Mather 1998].

In einer der neusten Studien wird von diesem Modell abgewichen. Nach Robenek et al. werden die Lipide nicht im ER gespeichert und gelangen auch nicht in der Membran des ER zum apikalen Zellpol, sondern sie entstehen nur in direkter Nachbarschaft zum ER. Die Membran des ER beinhaltet viele Proteine, die auch in das Lipidtröpfchen gelangen. Woher die das Lipidtröpfchen umschließende Phospholipideinzelschicht stammt, wird offen gelassen. [Robenek 2009]

1.1.4. Milk Fat Globules und Phospholipide

Milk fat globules (MFG) bestehen demnach aus einem Triglycerid-haltigen Kern, der von einer inneren einschichtigen Phospholipidmembran (wahrscheinlich ehemalige Membran des endoplasmatischen Retikulums) und einer äußeren Doppelmembran, entsprechend der ehemaligen Zellmembran, umgeben ist. Diese dreischichtige Membran ist die sogenannte Milchfettkugelmembran (MFGM milk fat globule membrane) [Patton 1975]. Ihre Dicke beträgt zwischen 10 und 50 nm [Lopez 2008]. Sie besteht aus einem variablen Proteinanteil von 20–60%, sowie einer Mischung von fetthaltigen Bestandteilen, nämlich Triacylglyceriden, Phospholipiden (ca 33 %), Glycolipiden und Cholesterol. Davon sind die fünf wichtigsten

Klassen der polaren Lipide wiederum Phosphatidylcholin (PC; 35%), Phosphatidylethanolamin (PE; 30%), Sphingomyelin (SM; 25%), Phosphatidylinositol (PI; 5%) und Phosphatidylserin (PS; 3%). Diese Daten stammen aus Kuhmilchanalysen [Lopez 2008]. Die MFGM besitzt viele wichtige Eigenschaften, ohne die es keine Milch in der Form, wie wir sie kennen, gäbe: ´

Die MFGM, ihre Zusammensetzung und Eigenschaften sind Gegenstand der derzeitigen Forschung [Gallier 2010, Fortunato 2003]. Durch ihre Emulgatoreigenschaften ermöglicht die MFGM die Dispersion der lipophilen Fettphase im wässrigen Milchplasma. Sie sorgt des Weiteren für die Stabilität der MFG und verhindert eine übermäßige Fusion dieser [McManaman 2003, Evers 2004]. Diese Emulgatoreigenschaften kommen vor allem durch die Struktureigenschaften der ambiphilen Phospholipide zustande und den hohen Anteil dieser in der MFGM. Tabelle 2 zeigt den Anteil der Phospholipide in Prozent des Lipidanteils der MFGM [Fong 2007].

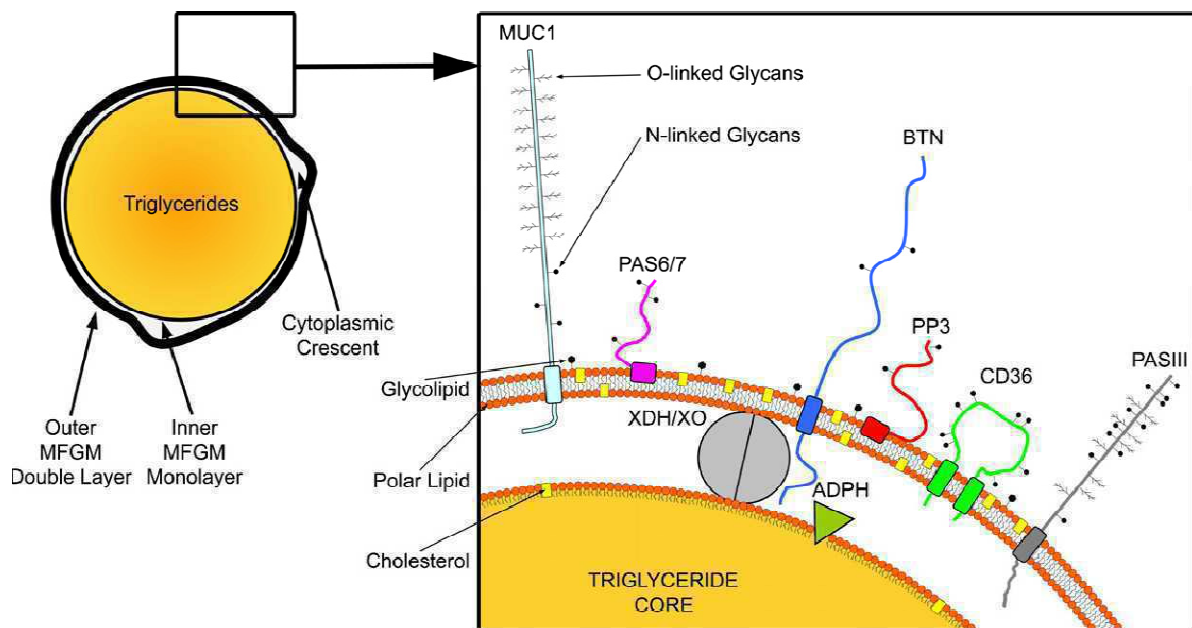


Abbildung 1.1.4-1: Schematischer Aufbau eines MFG mit Vergrößerungsausschnitt der MFGM und ihrer Proteine. In der Membran sitzen eine Vielzahl von Proteinen, wie zum Beispiel hier gezeigt ADPH, MUC1, BTN, CD36. Die Cholin enthaltenden Phospholipide, PC (Phosphatidylcholin) und SM (Sphingomyelin), und die Glycolipide, Cerebroside und Ganglioside, sind weitgehend an der Außenseite der Membran lokalisiert, während PE (Phosphatidylethanolamin), PS (Phosphatidylserin) und PI (Phosphatidylinositol) hauptsächlich an der Innenseite konzentriert sind. [Dewettinck et al. 2008]

Des Weiteren spielen Proteine und Phospholipide der MFGM eine Rolle bei Verteidigungsmechanismen des Neugeborenen gegen Bakterien und Viren [Fong 2007].

Zusätzlich schützen ihre Bestandteile die Darmmukosa der Neugeborenen vor Entzündungsprozessen und Krebsentstehung [Hintze 2011]. Außerdem sind für alle unten gezeigten Phospholipide (Abbildung 1.1.4-2) explizit protektive Eigenschaften für das Neugeborene bekannt [Dewettinck et al 2008]. Als Beispiel sei hier die nachgewiesene protektive Funktion von Phosphatidylcholin bezüglich der nekrotisierenden Enterokolitis des Neugeborenen genannt [Carlson 1998].

Zwischen der äußeren und inneren Schicht der MFGM kann beliebig viel Zytoplasma miteingeschlossen sein [Lopez 2011]. Abbildung 1.1.4-1 zeigt den schematischen Aufbau eines MFG und seiner Membran.

Tabelle 2: Überblick über die Lipidzusammensetzung der MFGM in Prozent der Gesamtlipide in Kuhmilch [Fong 2007]:

Lipid	in % Gesamtlipidgehalt
Triglyceride	56
Diglyceride	2.1
Monoglyceride	0.4
Freie Fettsäuren	0.9
Phospholipide	40.6

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, dass Phospholipide beinahe die Hälfte der Lipide der MFGM ausmachen. Die unterschiedlichen Phospholipide sind nicht nur wegen ihrer essentiellen Eigenschaften für die Milchbildung und protektiver Eigenschaften bezüglich des Neugeborenen, sondern auch insbesondere deswegen für diese Arbeit von Bedeutung, da das hier untersuchte Protein ABCA3 als Transporter einzelner Phospholipide in der Milchdrüse in Frage kommt (siehe Kapitel 1.3.2). Daher sollen die wichtigsten Phospholipide inklusive ihrer Eigenschaften im Zusammenhang mit Lipidmembranen im Folgenden vorgestellt werden:

Ein Phospholipid besteht aus zwei langkettigen Acylresten, die durch die hydrophile Kopfgruppe verbunden sind [Mohwald 1990]. Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: Glycerophospholipide und Sphingophospholipide. Glycerophospholipide haben als Grundbaustein Glycerin, Sphingophospholipide bestehen aus Ceramid (Sphingosin mit einer langkettigen Fettsäure). Die polare Kopfgruppe entscheidet über die weitere Klassifikation in die einzelnen Phospholipid-Untergruppen.

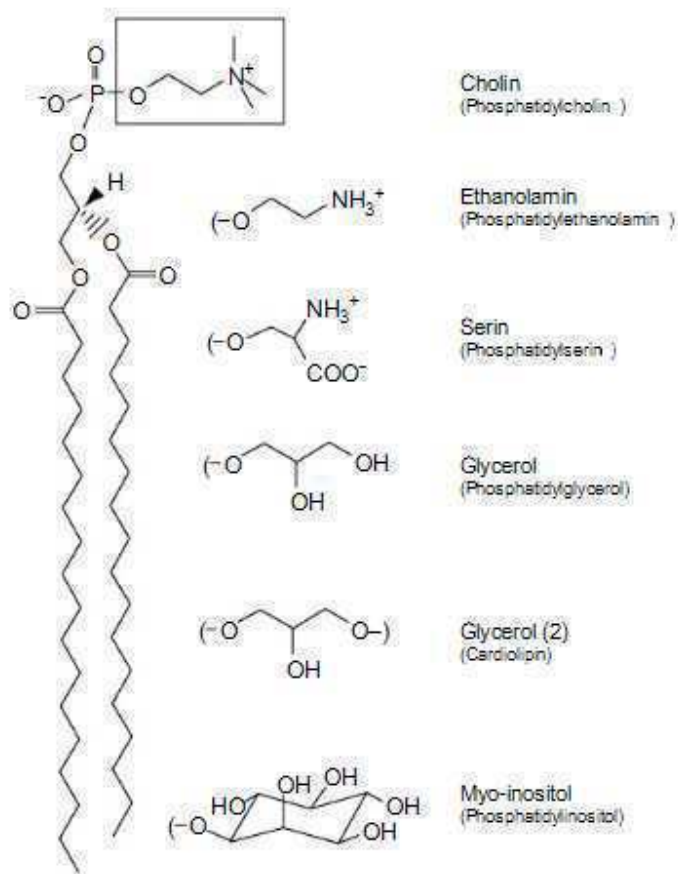


Abbildung 1.1.4-2: Chemische Struktur der Glycerophospholipide [Vance 2008]

Je nach Länge und Sättigungsgrad (ungesättigt, einfach/mehrfach gesättigt) der Fettsäurereste kann in einer Phospholipiduntergruppe weiter unterschieden werden. Als Beispiel sei hier Phosphatidylcholin PC 30:2 genannt. Es ist ein Glycerophospholipid mit Cholin als polarer Kopfgruppe. Die Acylreste bestehen aus je 30 C-Atomen und sind zweifach ungesättigt (das heißt in den Fettsäureketten befinden sich an zwei Stellen Doppelbindungen zwischen den C-Atomen an Stelle von Einfachbindungen). Dieser Aufbau mit der Kombination aus hydrophobem Schwanz (Fettsäurereste) und hydrophiler Kopfgruppe bedingt die sogenannten ambiphilen Eigenschaften der Phospholipide.

Abbildung 1.1.4-2 zeigt die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin.

Durch ihre ambiphile Struktur bilden Phospholipide in wässrigem Milieu spontan Mizellen oder Vesikel mit Lipiddoppelschichten. Dabei sind sie so angeordnet, dass die hydrophile Kopfgruppe nach außen zeigt und die hydrophoben Anteile nach innen [Vance 2008]. Durch diese Eigenschaft sind Phospholipide bestens geeignet eine Fett in Wasser Emulsion, wie sie in der Milch vorkommt, zu stabilisieren [Guo 2009].

1.2.ABC-Transporter

Alle Zellen und intrazellulären Kompartimente sind durch Lipidmembranen von einander und dem äußeren Umfeld getrennt. Diese Separation des intra- vom extrazellulären Raum macht nur Sinn, wenn ein selektiver und regulierter Stoffaustausch über die Membranen ermöglicht wird. Nährstoffe müssen eingeschleust werden, eine Vielzahl an Produkten muss wieder ausgeschleust werden. Auch für regulatorische Prozesse müssen Botenstoffe und Signale in beide Richtungen ausgetauscht werden können. Daher kommt dem Transmembran-Transport eine entscheidende Rolle für die Zellregulierung und das Zellüberleben zu. Der Transmembran-Transport wird von spezifischen Proteinen, die meist in der Lipidmembran liegen, vermittelt. Diese riesige Anzahl an Transportproteinen kann in einige größere Superfamilien eingeteilt werden.

Die größte Familie von Transmembran-Transportern sind die sogenannten ATP-binding cassette (ABC) –Transporter [Dean 2001]. Ihre Gemeinsamkeit besteht darin, dass sie den Transport von spezifischen Substraten über Lipidmembranen mit Hilfe der Energie von ATP vermitteln [Higgins, C.F. 1992]. Die meisten ABC-Transporter sind aktive Transporter. Einige Ausnahmen sind vorhanden, wie zum Beispiel der CFTR (ABCC7) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, der als regulierbarer Chloridionenkanal fungiert und bei Defekten zum Krankheitsbild der Cystischen Fibrose führt. Alle eukariotischen ABC-Transporter sind Exporter, das heißt, sie vermitteln den Transport von Substraten aus dem Zytoplasma heraus, entweder in den extrazellulären Raum oder in intrazelluläre Kompartimente, wie zum Beispiel Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen oder Lamellarkörperchen. Importer wurden bisher nur in Prokaryoten gefunden [Locher 2009]. Es ist kein ABC-Transporter bekannt, der in beide Richtungen transportieren kann.

Insgesamt existieren 49 ABC-Transport-Proteine im Proteom [Takahashi 2005]. Diese können nach Sequenzähnlichkeit sieben Subfamilien (A bis G) der ABC-Transporter zugeordnet werden. Ursprünglich galt das Hauptaugenmerk der Forschung bezüglich der menschlichen ABC-Transporter ihrer Rolle als Efflux-Pumpen, die die Zelle vor toxischen Substanzen schützen, und dadurch auch die sogenannte Multidrug Resistance von Krebszellen vermitteln können. Beispiele hierfür sind ABCB1 (MDR 1), oder ABCC1 (MRP 1). Die Entdeckung dieser beiden Efflux-Pumpen hatte einen großen Einfluss auf die Krebschemotherapie und Pharmakodynamik [Takahashi 2005; Gros 1986; Ueda 1987].

Ein weiteres großes und erst seit kürzerer Zeit erforschtes Feld der ABC-Transporter ist ihre Bedeutung für den Lipidstoffwechsel. 1993 wurde erstmals ABCB4 (MDR2) als ein Phosphatidylcholin-Transporter identifiziert, der für die Gallensekretion unabdingbar ist [Smit 1993]. Des Weiteren wurde 1999 entdeckt, dass Mutationen im ABCA1-Gen zu der Tangier Krankheit führen, einer seltenen Erbkrankheit, bei der die Freisetzung von Cholesterin aus der Zelle beeinträchtigt und die HDL-Konzentration stark vermindert ist [McNeish 2000, Hayden 1999].

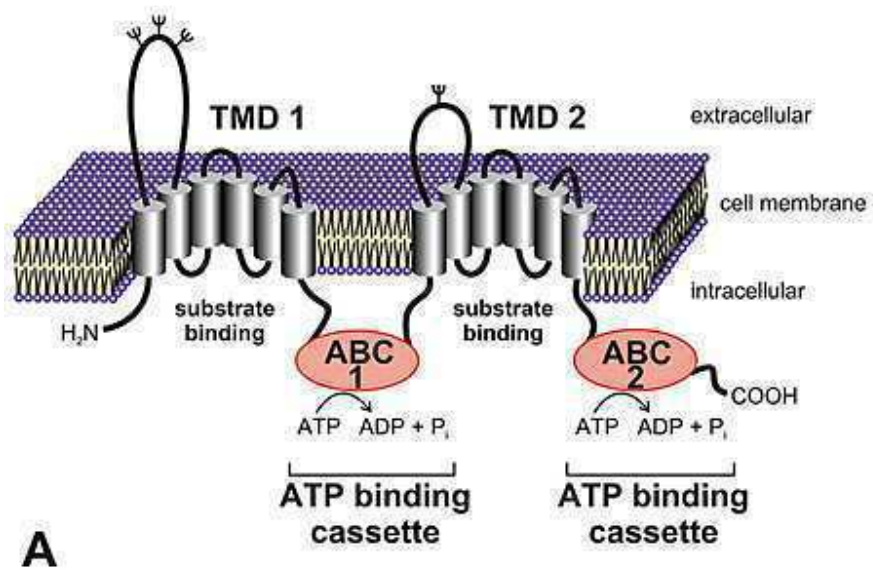
In diesem Zusammenhang vermitteln die ABC-Transporter den Efflux von hydrophoben Lipidmolekülen unterschiedlichster Lipidklassen über die Membran der Zelle oder eines intrazellulären Kompartiments meist direkt auf ein Akzeptor-Molekül. Im Fall von ABCA1 ist dieser Akzeptor Apolipoprotein A1 (apoA-I), aus dem wiederum HDL entsteht.

1.2.1. Struktur und Funktion

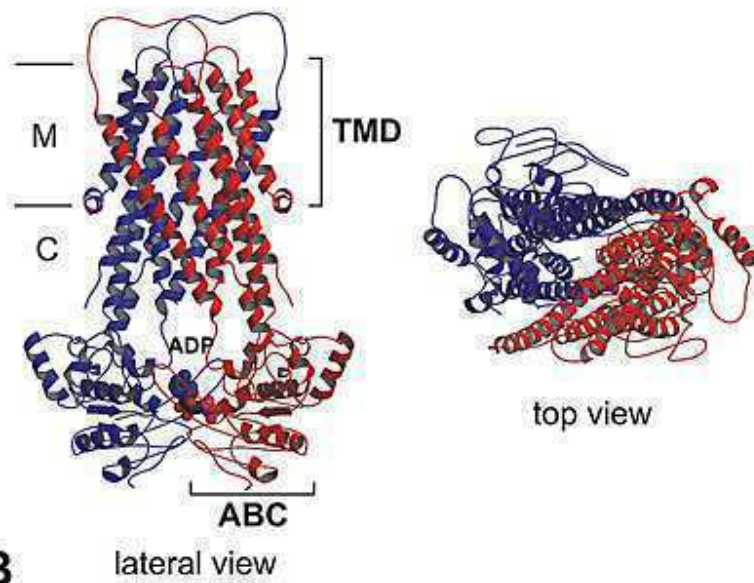
ABC-Transporter enthalten jeweils ein Paar ATP-bindender Domänen (ABC), die in den sogenannten Nukleotid bindenden Domänen (NBD) liegen, und je zwei Transmembrandomänen (TM), die aus mehreren membran-spannenden α -Helices bestehen. Diese hydrophoben Transmembrandomänen bilden den Weg, durch den das auszuschleußende Substrat die Lipiddoppelschicht durchqueren kann. Es werden insgesamt mindestens diese vier Domänen als minimale funktionelle Einheit für einen funktionierenden ABC-Transporter benötigt [Higgins, C.F. 2004, Locher 2004, Jones 2004] (siehe Abbildung 1.2.1-1). In eukariotischen Zellen liegen die ABC-Transporter entweder als Voll- oder als Halbtransporter vor. Bei den Volltransportern kodiert ein Gen für alle vier Domänen. Die Halbtransporter bestehen nur aus jeweils einer TM-Domäne und einer NBD-Domäne. Sie lagern sich entweder gegenseitig oder mit einem anderen Halbtransporter zu einer funktionellen Einheit zusammen. Die menschlichen ABC-Transporter sind zumeist Volltransporter.

Die NBD aller ABC-Transporter haben weite Aminosäuresequenzen gemeinsam und beinhalten mehrere charakteristische konservierte Motive. Das Walker A (P-Loop) und Walker B Motiv kommt auch in anderen nukleotidbindenden Proteinen vor. Diese beiden Domänen binden und hydrolysieren das ATP. Das Signaturmotiv, auch Walker C genannt, der Histidin-Loop (auch als „Switch“ bezeichnet) und eine weniger stark konservierte Zentralregion sind bezeichnend für ABC-Transporter. Ihre genaue Rolle auf Ebene der molekularen Mechanismen ist noch nicht völlig geklärt [Higgins, C.F. 2004].

Dagegen zeigen die Transmembrandomänen zwar eine grob einheitliche Architektur, sie besitzen aber keine hoch-konservierten Sequenzen und können eine unterschiedliche Anzahl an α -Helices aufweisen. Das mag unter anderem mit der großen Vielzahl an Substraten zusammenhängen, die von ABC-Transportern ausgeschleust werden [Hollenstein 2007]. Dabei gibt es Transporter, die mehrere Substrate relativ unspezifisch transportieren können, die meisten Transporter sind jedoch sehr spezifisch für ein spezielles Substrat.



A



B

Abbildung 1.2.1-1: A schematische Darstellung eines ABC-Transporters mit seinen vier Domänen; B Bänderdarstellung eines ABC-Transporters in der lateralen Ansicht und von oben gesehen [Wenzel 2007]

1.2.2. Assoziierte Krankheiten

Tabelle 3: Übersicht der wichtigsten ABC-Transporter mit bevorzugter Organexpression und assoziierten Krankheiten

Gen	Synonym	Expression	Korrelierende Krankheit
ABCA1	ABC1	ubiquitär	Morbus Tangier
ABCA2	ABC2	Gehirn	Demenz vom Alzheimertyp
ABCA3	ABC3	Lunge	Surfactantmangel-Syndrom
ABCA4	ABCR	Retina	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie
ABCA7	ABC7	Milz, Thymus	Sjörgen Syndrom
ABCA12	ABC12	Magen	Harlekin-Ichthyose
ABCB1	MDR1	Nebenniere, Niere, Gehirn	Colitis ulcerosa
ABCB2	TAP1	Ubiquitär	Immundefizienz
ABCB3	TAP2	Ubiquitär	M. Wegener-ähnliche Granulomatose
ABCB4	PGY3	Leber	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3 (PFIC-3)
ABCB7	ABC7	Mitochondrien	X-chromosomale Sideroblastose und Anämie
ABCB11	SPGP	Leber	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC-2)
ABCC1	MRP1	Lunge, Blut	Neoplasien, Multidrug Resistance assoziiertes Protein 1
ABCC2	MRP2	Leber	Dubin-Johnson-Syndrom
ABCC6	MRP6	Niere, Leber	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC7	CFTR	Exokrine Gewebe	Zystische Fibrose (Mukoviszidose)
ABCC8	SUR1	Pankreas	Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämien
ABCC9	SUR2	Herz, Muskel	Dilatative Kardiomyopathie
ABCD1	ALD	Peroxisom	Adrenoleukodystrophie
ABCD3	PXMP1	Peroxisom	Zellweger Syndrom Typ II
ABCG2	MXR, BCRP	Plazenta, GI	Protoporphyrin IX
ABCG5	White 3	Leber	Beta-Sitosterolämie (Phytosterolämie)
ABCG8	White4	Leber, GI	Beta-Sitosterolämie (Phytosterolämie)

Die Bedeutung der ABC-Transporter für die Medizin wird auch ersichtlich, wenn man sieht mit wie vielen verschiedenen Krankheiten Mutationen in den unterschiedlichsten ABC-Transportern assoziiert sind. In Kapitel 1.2 wurden bereits Beispiele, wie die Multidrug-Resistance und die Tangier-Krankheit, genannt. So vielfältig, wie die Substrate der einzelnen ABC-Transporter und die Expression der entsprechenden Gene in den unterschiedlichsten Gewebearten ist, so viele verschiedene Krankheitsbilder können auch meist durch Mutationen in den einzelnen Genen entstehen. In Tabelle 3 soll eine Übersicht über die wichtigsten und häufigsten ABC-Transportergene, das entsprechende Gewebe mit der häufigsten Expression und die jeweiligen assoziierten Krankheiten gegeben werden [Dean 2001, Stefkova 2004].

1.2.3. Die ABCA-Subfamilie

ABCA1 und ABCA2, ursprünglich bekannt als ABC1 und ABC2, waren die ersten beiden Transporter der ABCA-Subfamilie, die 1993 von Luciani et al. in der Maus identifiziert wurden [Luciani et al. 1994]. Sie gelten als die Prototypen dieser Familie. In den letzten Jahren kamen 10 weitere funktionelle ABC-Transporter dazu, die aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten zu der ABCA-Subfamilie gerechnet wurden [Kaminski 2006].

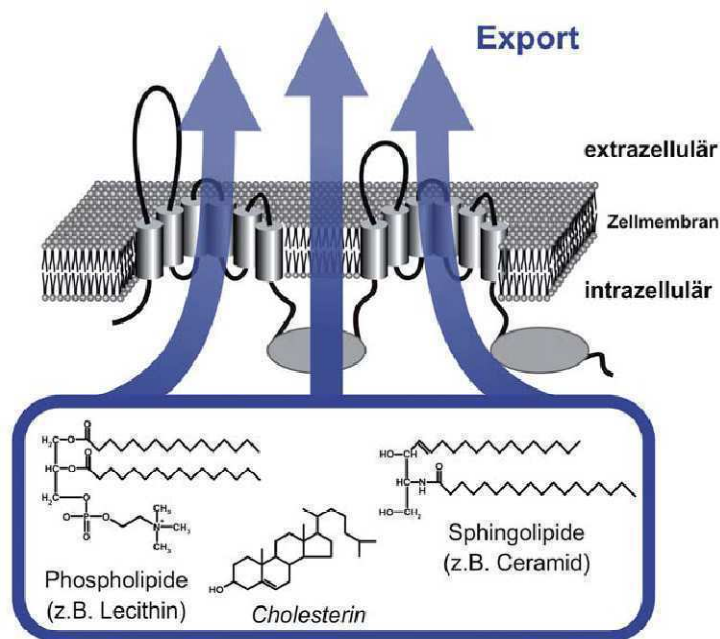


Abbildung 1.2.3-1: Schematische Darstellung eines ABC-Transporters aus der lipidtransportierenden ABCA-Subfamilie mit den häufigsten Substraten. Die Pfeile geben die Richtung des Transports an: alle eukariotischen ABC-Transporter sind Exporter [Wenzel 2007]

Die ABCA-Subfamilie enthält die längsten bekannten ABC-Proteine (bis zu über 2.100 Aminosäuren lang) und besteht aus 12 Volltransportern, die wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe enthält die sieben Gene ABCA1 – 4, A7, A12 und A13, die auf sechs verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die zweite Gruppe bildet ein Gencluster aus den Genen ABCA5, A6, A8 – A10 auf Chromosom 17q24. Phylogenetische Analysen zeigen, dass das Gencluster auf Chromosom 17 eine eigene Untergruppe bildet („ABCA6-like transporters“). Analysen der Splice-Stellen ergaben, dass diese Untergruppe jeweils 38 Introns besitzen, während die anderen ABCA-Gene 50 bis 51 Introns haben.

Es finden sich im Genom von *Drosophila* oder *C.elegans* keine der ABCA-Subfamilie entsprechenden Gene. Dies deutet darauf hin, dass diese Untergruppe nach der Trennung der Wirbeltiere von Insekten und Würmern entstanden ist [Dean 2001].

Die Bedeutung dieser Subfamilie liegt vor allem in der zellulären Lipid-Homöostase und im Lipidtransport [Quazi 2011]. Ihre Dysfunktion ist oft mit Krankheits-Phänotypen assoziiert. Wie bereits erwähnt spielt ABCA1 eine wichtige Rolle für die Bildung von HDL-Partikeln und damit den Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber. Auch ABCA2 und ABCA7 [Kaminski 2000] spielen eine wichtige Rolle für den Cholesterin- und Phospholipid-Haushalt der Zelle [Albrecht 2007, Abe-Dohmae 2003].

1.3. ABCA3

Bekannt ist das Gen *ABCA3* seit 1996. Es wurde erstmals von Klugbauer et al. aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom kloniert und unter dem Namen ABC-C publiziert [Klugbauer 1996]. Einige Jahre später wurde es ersichtlich, dass dieses ABC-C Gen, sowie das in Rattenlungen entdeckte Protein LBM180 [Zen 1998] beide dem ABCA3-Transporter entsprechen [Mulugeta 2002]. Dieser besteht aus 1704 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 190 kDa [Yamano 2001]. Das dazugehörige Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 16p13.3 [Connors 1997]. Die kodierende Region besteht aus 33 Exons, was einer Transkriptlänge von 6466 Basenpaaren entspricht. Bei der Maus liegt das *Abca3*-Gen auf Chromosom 17b2, besitzt aber ebenfalls 33 Exons und das Protein besteht auch aus 1704 Aminosäuren.

ABCA3 zeigt die höchste Expression in der Lunge. Die genaue Lokalisation und Funktion von ABCA3 in der Lunge und die Folgen von Nicht-Expression aufgrund von Mutationen in diesem Gen wird im nächsten Kapitel genauer erläutert werden. Daneben wird ABCA3 aber auch in anderen Gewebearten exprimiert, darunter im Knochenmark. Dort scheint ABCA3 eine wichtige Rolle in Zellen des hämatopoetischen Systems zu spielen, insbesondere bei Entartung dieser Zellen. Es gibt Hinweise auf ABCA3 Expression in allen Haupttypen maligner lymphohämatopoetischer Erkrankungen [Chapuy 2008]. Es wurde festgestellt, dass in B-Zell Lymphom-Zellen, CML- und AML-Zellen die Ansprechrate auf Chemotherapeutika umso geringer ist, je mehr ABCA3 von diesen Zellen exprimiert wird. ABCA3 ist hier im späten endosomalen System, multivesikulären und -lamelläre Körperchen und Lysosomen lokalisiert und für die Multidrug Resistance dieser Zellen verantwortlich [Chapuy 2009, Aung 2011, Song 2008]. Weitere Gewebe mit ABCA3-Expression sind Niere [Huls 2006], Gehirn, Cerebellum, Leber, Pankreas, Gastrointestinaltrakt [Stahlman 2007] und die Brustdrüse [Schimanski 2010]. Die Rolle von ABCA3 in diesen Geweben ist noch weitgehend ungeklärt.

1.3.1. Die Rolle von ABCA3 in der Lunge

In der Lunge weist ABCA3 mit Abstand die höchste Expression auf. Es wird dort ausschließlich in Typ II Pneumozyten exprimiert, in denen es in der äußeren (=„limiting“) Membran der Lamellarkörperchen sitzt. Lamellarkörperchen sind spezialisierte Zellorganellen

der Surfactantsynthese. Die Synthese der einzelnen Surfactantkomponenten beginnt im endoplasmatischen Retikulum der Typ II Pneumozyten, der Zusammenbau der einzelnen Komponenten und die intrazelluläre Speicherung erfolgt dann in den Lamellarkörperchen. Sie beinhalten mehrere Schichten aus Phospholipiden und werden mittels Exozytose in den Alveolarraum sezerniert [Ban 2007].

Surfactant steht für „Surface active agent“. Es ist ein Phospholipid-Protein-Gemisch, das die Alveolen an der Luft-Wasser-Grenze auskleidet, um deren Oberflächenspannung herabzusetzen und die Entfaltung der Lunge zu ermöglichen beziehungsweise die Entstehung von endexpiratorischen Atelektasen beim normalen Atmen zu verhindern. Diese oberflächenaktive Wirkung beruht hauptsächlich auf der amphiphilen Struktur der Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol. Eine korrekte Zusammensetzung und Homöostase des Surfactants ist notwendig für die adäquate Funktion und den Gasaustausch in den Lungenalveolen. Seine Zusammensetzung besteht aus annähernd 90% Phospholipiden und 10% Surfactantproteinen, wobei das wichtigste Surfactant-Phospholipid Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin ist [Garmany 2006].

Die ABCA3 Expression in der Lunge steigt mit zunehmendem Gestationsalter an und hat den höchsten Punkt zum Zeitpunkt der Geburt erreicht. Die Expression wird in vitro auch durch Glukokortikoide hochreguliert. Dies weist auf die Bedeutung von ABCA3 für die Lungenentfaltung und Atmung in der Neonatalperiode hin [Bullard 2006].

Mutationen im *ABCA3*-Gen führen bei Neugeborenen zu einem schweren Atemnotsyndrom mit Surfactantmangel und veränderter Surfactantzusammensetzung [Hamvas 2010, Brasch 2006, Shulenin 2004, Hallman 2004]. Auch nach der Neonatalperiode sind interstitielle Lungenerkrankungen bei Kindern mit teilweise milderer Mutationen im *ABCA3*-Gen assoziiert [Flamein 2012, Whitsett 2006, Bullard 2005, Hartl 2005]. Die bekannteste Mutation E292V wurde in einer hochkonservierten Region als Punktmutation, die im Austausch einer Aminosäure resultiert, gefunden. Nach Matsumara et al. können Mutationen im *ABCA3*-Gen, die zu Surfactantmangel führen, in zwei Gruppen unterteilt werden. Typ I Mutationen resultieren in gestörter intrazellulärer Prozessierung des Proteins, Typ II Mutationen vermindern die Aktivität der ATP-Hydrolyse [Matsumara 2006]. Dabei müssen auf beiden Allelen Mutationen (auch unterschiedlicher Typen) vorliegen, damit es zu der Ausbildung eines klinisch relevanten Phänotyps kommt. In einer der neusten Studien wird gezeigt, dass auch Mutationen in nicht kodierenden DNA-Abschnitten von *ABCA3* zu Lungenerkrankungen führen können, die eine ABCA3-Defizienz bei negativen genetischen Studien erklären würden [Agrawal 2012].

In den letzten Jahren wurde - unter Einschluss unserer Arbeitsgruppe - der ABCA3-Transporter intensiver anhand von *Abca3*^{-/-} Knockout-Mäusen erforscht [Cheong 2007, Hammel 2007, Fitzgerald 2007, Besnard 2010]. Es stellte sich heraus, dass die homozygoten *Abca3*^{-/-} Knockout-Mäuse innerhalb der ersten Stunde nach der Geburt an Lungenversagen sterben. Die intrauterine Entwicklung dieser Mäuse war ohne Auffälligkeiten. Sie schafften es

nach der Geburt allerdings nicht, die komplett atelektatischen Lungen zu entfalten. Sie wiesen fast keinen Surfactant und abnormale Lamellarkörperchen auf. Auch Surfactant Protein B, das in den Lamellarkörperchen gespeichert wird, war in den Alveolen dieser Mäuse signifikant erniedrigt. Somit ist ABCA3 wesentlich an der Formation der Lamellarkörperchen sowie an der Sekretion von Surfactant beteiligt. Analysen des Phospholipidgehalts und der Phospholipidzusammensetzung der Lungen von *Abca3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp zeigten einige interessante Unterschiede. Phosphatidylglycerin und kurzkettiges Phosphatidylcholin waren in den Lungen der homozygoten Knockout-Mäuse signifikant erniedrigt. Andere Phospholipide und Cholesterin zeigten keine Veränderung gegenüber Wildtyp-Lungen [Fitzgerald 2007]. Daraus und aus der Tatsache, dass andere ABCA-Transporter in den Transport von Lipiden über biologische Membranen involviert sind, lässt sich schließen, dass PG und PC Transportsubstrate von ABCA3 sind.

Interessanterweise entwickelten sich heterozygote *Abca3*^{+/-} Knockout-Mäuse ganz normal und hatten keinerlei Schwierigkeiten bei der postnatalen Adaption der Lunge an das Atmen. Das Vorhandensein eines Allels scheint für eine adäquate Funktion von ABCA3 sowohl in der Lunge als auch in anderen Geweben ausreichend zu sein. Auch in einer Studie konditioneller *Abca3* Knockout-Mäuse, die in der Lunge nur noch eine sehr geringe Restaktivität von *Abca3* aufwiesen, reichte diese Restaktivität aus, dass ein Drittel dieser Mäuse nach der Geburt überlebten [Besnard 2010].

Zusammenfassend ist ABCA3 in der Lunge ein Phospholipidtransporter in den auf Surfactantsynthese spezialisierten Typ II Pneumozyten. Seine genaue Funktion ist auf molekularer Ebene noch nicht letztendlich geklärt. Er spielt aber eine wichtige Rolle für die ausreichende Sekretion von Surfactant und somit für die Entfaltung der Lunge nach der Geburt. ABCA3-Gendefekte verursachen schweres Atemversagen bei Neugeborenen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus.

1.3.2. Die Rolle von ABCA3 in der Milchdrüse

In der murinen Milchdrüse ist die *Abca3*-Expression molekularbiologisch auf Ebene der mRNA nachgewiesen worden [Hammel 2007]. Des Weiteren ist ABCA3 in immunhistochemischen Färbungen von humaner und muriner Milch darstellbar. Dort ist es auf der Außenseite der MFGM lokalisiert [bislang nicht veröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe].

Im vorangegangenen Kapitel wurde ABCA3 als Phospholipidtransporter in der Lunge näher beschrieben. In der Milchdrüse ist über den Mechanismus, mit dem ABCA3 an der Milchsekretion beteiligt sein könnte, nicht viel bekannt. Es kann aber analog zu der Rolle in der Lunge davon ausgegangen werden, dass ABCA3 auch in der Milchdrüse Phospholipide transportiert. Wie schon in Kapitel 1.1.4 genannt, verfügen Phospholipide über wichtige Eigenschaften in der Milch als Emulgatoren und gegenüber dem Neugeborenen

(Schutzfunktion). Ein Einschnitt in der Phospholipid-Sekretion könnte demnach zu nachteiligen Auswirkungen auf das Neugeborene führen [Isaacs 2005, Buchman 2001, Steven 2000, Hamosh 1999, Carlson 1998, Armand 1996].

Es ist seit kurzem bekannt, dass ABCA3 in der menschlichen Brustdrüse, genauer in den Milchdrüsenepithelzellen, exprimiert wird. Die Expression von ABCA3 wird in dieser Studie im Zusammenhang mit Brustkrebszellen untersucht. Eine hohe Expression von ABCA3 ist mit einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert [Schimanski 2010]. Schimanski et al. nimmt eine sich ergänzende Rolle von ABCA3 und ABCA1 für den Lipidtransport und die Lipidsekretion in der Brustdrüse an. Möglicherweise ist die Expression von ABCA3 lediglich Ausdruck der spezifischen Differenzierung eines Karzinoms und damit mit der Prognose korreliert.

1.4.Mausmodell

Die Maus eignet sich aus mehreren Gründen als Modell zur Untersuchung von Gendefekten im Allgemeinen und der verschiedenen ABCA3-Gendefekte im Speziellen. Zum einen wegen der Verfügbarkeit muriner embryonaler Stammzellen und der damit verbundenen Möglichkeit der genetischen Veränderung. Zum anderen ist die Physiologie der meisten Organe der Maus als Säugetier mit der des Menschen gut vergleichbar. Damit sind auf der Maus basierende Forschungsergebnisse zwar bedingt, aber dennoch gut auf den Menschen übertragbar. Weitere Gründe, wie leichtes Handling und eine hohe Vermehrungsrate führten zu einem vielfältigen Einsatz der Maus in der biomedizinischen Forschung. Daher sind viele ihrer biologischen und genetischen Daten verfügbar. [Hackbarth 1995]

1.4.1. Das *Cre-loxP*-System

Es sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden bekannt, sogenannte Knockout-Mäuse zu generieren, um die Funktion eines Genes und seines Produktes in vivo untersuchen und genauer charakterisieren zu können. Zumeist wird das Zielgen in embryonalen Stammzellen inaktiviert. Aus diesen veränderten Zellen entsteht per Blastozysteninjektion und Embryotransfer in eine Leihmutter die genveränderte Maus. Daraus resultieren immer Mäuse, die den auf diese Weise herbeigeführten Gendefekt bereits vom Stadium der Zygote ab in allen Zellen tragen. Führt dieser Knockout nun aber als erste Manifestation des Gendefekts zu einem Versterben in einer frühen Entwicklungsphase, ist eine weitere Analyse der Funktion des Gens in der späteren Entwicklung und in anderen Organen mit diesem Modell nicht möglich.

Im Fall von ABCA3 ist dieses Modell deshalb nicht anwendbar, da *Abca3*^{-/-} Mäuse direkt nach der Geburt an Lungenversagen sterben. Um dieses Problem zu umgehen wurde eine Methode angewandt, um eine konditionale Mutante zu erzeugen. Ein konditioneller Knockout findet

nur in bestimmten Gewebearten und/oder zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung statt. Es ist damit sogar möglich, Zielgene aus- und wieder anzuschalten. Angeschaltet heißt, dass das Gen auf hohem Level exprimiert wird, ausgeschaltet, dass möglichst keine Genaktivität vorhanden ist. Um dies zu erreichen stehen mehrere Systeme zur Verfügung, wie zum Beispiel das *Cre/loxP*-System oder das TetR System [Lewandoski 2001]. Hier soll nun näher auf das in dieser Arbeit verwendete *Cre/loxP*-System eingegangen werden.

Das *Cre/loxP*-System ist, wie alle konditionalen Knockout Modelle, ein binäres System, bei dem die Genexpression durch die Interaktion folgender zwei Komponenten kontrolliert wird: Ein steuerbares „Effektor“ Transgen, dessen Produkt das gekennzeichnete Zielgen manipuliert. Dieses „Effektor“ Transgen ist das *Cre*-Gen (**C**yclisation **R**ecombination) des Bakteriophagen P1 [Lewandoski 2001]. Sein Produkt, die 38-kDa Cre-Rekombinase, ist eine sequenzspezifische DNA Rekombinase der Integrase Familie. Cre erkennt eine 34-bp Sequenz auf dem P1 Genom, die *loxP* (**l**ocus of **X**-over of **P**1) heißt, und katalysiert die reziproke DNA Rekombination zwischen zwei *loxP*-Stellen [Sauer 1998]. Die *loxP*-Sequenz besteht aus einer zentralen Region mit acht Basenpaaren (gibt die Orientierung vor), welche von zwei palindromischen Sequenzen mit je 13 Basenpaaren Länge flankiert wird.

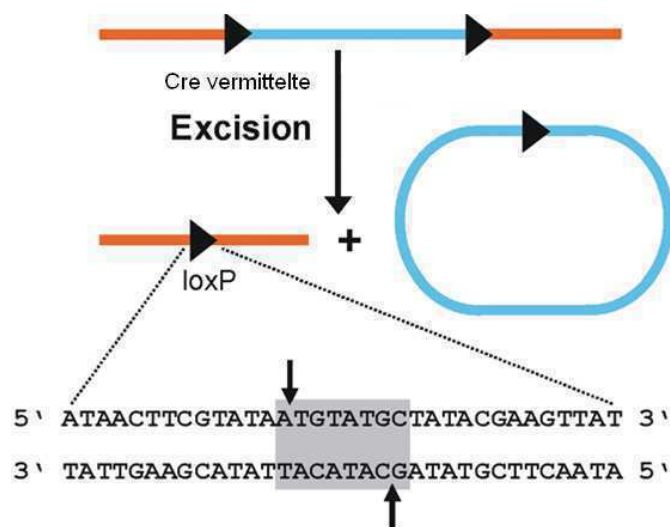


Abbildung 1.4.1-1: *Cre/loxP*-vermittelte Exzision von DNA. Die Basenfolge der *loxP*-Sequenz (Dreieck) ist angegeben und die zentrale Region, innerhalb der die Rekombination erfolgt, hervorgehoben. Die Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. [Lukowski 2005]

Ein chromosomales DNA-Segment, das zwischen zwei gleichgerichteten *loxP*-Sequenzen liegt (ein sogenanntes „gefloxtes“ DNA-Segment), wird durch die Cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes aus dem Chromosom herausgeschnitten und in der Zelle abgebaut. Auf dem Chromosom bleibt eine einzelne *loxP*-Sequenz zurück. Je nach Orientierung und Lage der beiden *loxP*-Sequenzen können noch weitere DNA Transaktionen erzeugt werden,

zum Beispiel Inversionen und Chromosomentranslokationen [Lukowski 2005]. Das Temperaturoptimum der Cre-Rekombinase liegt bei ca 37° C. Deshalb ist es in Mäusen sehr effektiv [Schenkel 1995].

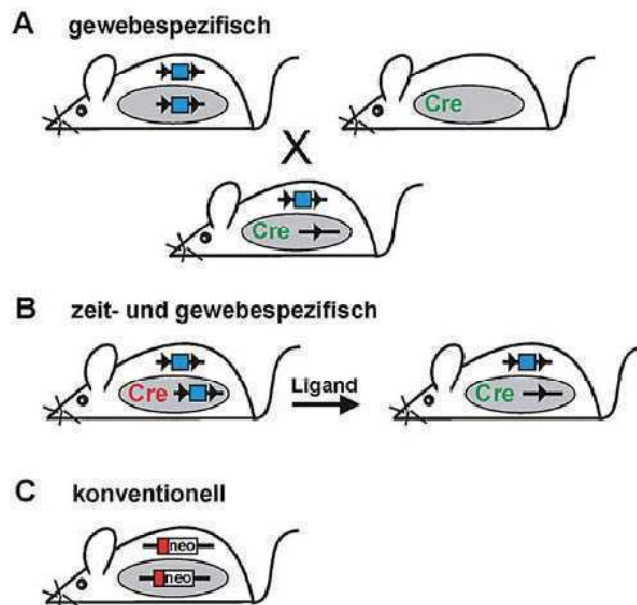


Abbildung 1.4.1-2: Konditionale und konventionelle Deletion von Mausgenen. (A) Zur gewebespezifischen Gendeletion wird eine geflochte Zielmaus (Dreiecke stellen *loxP*-Sequenzen dar und blaue Vierecke ein Exon) mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verkreuzt. Die Cre-Expression wird durch gewebespezifische Promotoren kontrolliert. Die Exzision des Exons findet nur in den Zellen statt, in denen der Promotor aktiv ist (graue Ellipse). (B) Eine zeitliche Kontrolle der Rekombination kann durch die Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen erfolgen, die zunächst inaktiv sind (rot) und erst nach Gabe des Liganden (z.B. Tamoxifen) aktiviert werden (grün). (C) Bei der konventionellen Gendeletion wird ein Exon (rotes Viereck) permanent in der Keimbahn zerstört, z.B. durch Einbau eines Neomycinresistenzgens (*neo*). [Lukowski 2005]

Um nun eine konditionelle Knockout-Maus zu erhalten ist die Kreuzung zweier verschiedener Mäuse nötig. Die eine Maus trägt in allen Zellen das geflochte Zielgen. Dieses ist durch die *loxP*-Flankierung in seiner Funktion nicht beeinträchtigt, da die *loxP*-Sequenzen in Introns liegen. Die zweite Maus besitzt das Gen der Cre-Rekombinase unter einem bestimmten Promoter. Dieser Promoter wird so gewählt, dass die Cre-Rekombinase nur in dem gewünschten Gewebe exprimiert wird. Treffen nun das geflochte Zielgen und die Cre-Rekombinase in dem Zielgewebe aufeinander, kommt es zur Rekombination und aus dem Zielgen wird die flankierte Region herausgeschnitten. Das Zielgen ist hiermit inaktiviert. [Zheng 2000]

Dieses System kann noch durch eine zeitliche Komponente erweitert werden. Zum Beispiel kann die Expression von Cre durch die Verwendung Tetracyclin abhängiger oder Interferon-induzierbarer Promotoren kontrolliert werden [Kühn 1995, St-Onge 1996]. Damit wird die Cre-Rekombinase nur in einem bestimmten Gewebe und zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv. So können Gene zu den gewünschten Zeitpunkten „angeschaltet“ beziehungsweise wieder „abgeschaltet“ werden. Die Entwicklung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen lässt die örtliche und zeitliche Steuerung des Knockouts zu [Feil 1996] (siehe Abbildung 1.4.1-2).

Der Promoter selbst unterliegt auch einer spezifischen Regulation. Daher ist je nach Regulation des Promotors auch in „nur“ gewebespezifischen konditionalen Genknockouts eine zeitliche Komponente immer mit enthalten. Wird der Promoter schon zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung aktiv, erfolgt die Cre-vermittelte Exzision im geflochtenen Zielgen auch zu diesem frühen Zeitpunkt. Wird der Promoter erst sehr spät, zum Beispiel im schon ausdifferenzierten Gewebe, aktiv, so erfolgt der Knockout erst dann. Die milchdrüsenspezifischen Promotoren und deren Regulation werden im Folgenden genauer untersucht.

1.4.2. Milchdrüsenspezifische Promoter

Für einen gewebespezifischen Knockout mittels des *Cre/LoxP*-System ist die Wahl des Promotors, unter dem Cre exprimiert wird, entscheidend. Da das Zielgen in allen Zellen der Maus geflocht ist, darf Cre nur in dem gewünschten Gewebe exprimiert werden. Das heißt, der Promoter muss möglichst gewebespezifisch sein und auch früh genug beziehungsweise zum gewünschten Zeitpunkt in der Entwicklung des Organs aktiv sein. Des Weiteren muss er für eine ausreichende Menge an Cre sorgen, um das geflochte Gen zu inaktivieren.

Es wurden schon eine Vielzahl an mammaspezifischen Promotoren verwendet, um ein nachgeschaltetes Gen zu überexprimieren, unter anderem auch der oBLG-Promoter [Niavarani 2005]. Dabei wurden auch immer wieder Speziesgrenzen überschritten (zum Beispiel Verwendung eines bovinen Promotors in der Ratte), was auf die hohe Konservierung genetischer Elemente für die Regulation der mammaspezifischen Expression hindeutet [Bawden 1994]. In neueren Studien am Mausmodell wurden drei Promotoren besonders häufig verwendet: der ovine beta-Laktoglobulin Promoter (oBLG), der Promoter des Whey acidic protein (WAP) und der des Maus Mamma Tumor Virus Long Tandem Repeat (MMTV-LTR) [Palmer 2006].

Bereits 1997 erschien eine Studie, in der die Unterschiede von WAP und MMTV-LTR im *Cre/loxP*-System untersucht wurden [Wagner et al. 1997]. Diese kam zu dem Schluss, dass MMTV-LTR als Promoter für dieses System weniger geeignet sei aufgrund von geringer Gewebespezifität und geringerer Effektivität [Palmer 2006]. BLG und WAP Promotor werden beide im Zusammenhang mit Cre verwendet. Sie sollen hier kurz vorgestellt werden.

Beta-Laktoglobulin (BLG) ist das Hauptmilchprotein von Wiederkäuern. Nagetiere dagegen besitzen es nicht. Dennoch wird ein BLG-Transgen in der Maus normal und zeitgerecht während Schwangerschaft und Laktation exprimiert [Simons 1987, Whitelaw 1992]. Darüber hinaus werden BLG-Konstrukte in der Milchdrüse sowohl räumlich (begrenzt auf das Mammagewebe) als auch zeitlich begrenzt exprimiert.

Selbert et al. zeigt, dass die Expression eines Gens unter dem BLG-Promoter eine hohe Gewebespezifität aufweist. Die BLG-cre vermittelte Gendeletion eines geflochten Gens in der nicht laktierenden Milchdrüse liegt bei etwa 7%. An Tag 15 der Schwangerschaft bei 30% und erreicht seinen Peak mit 70-80% an Tag 10 der Laktation. Die verbleibenden 20% der Zellen, in denen keine Gendeletion stattgefunden hat, werden auf Fettzellen und Bindegewebszellen der Milchdrüse zurückgeführt [Selbert 1998].

WAP (whey acidic protein) dagegen ist das Hauptmilchprotein von Nagetieren. Die Expression von WAP beginnt etwas später als BLG gegen Ende der Schwangerschaft (Tag 14 – 16) [Barash 1999]. Der WAP Promoter weist auch hohe Gewebespezifität auf, allerdings wurde in Gehirnzellen ektopy Expression nachgewiesen [Günzburg 1991]. In einer Studie, die die Expressionsraten eines Gens einmal unter dem WAP- und einmal unter dem BLG-Promoter untersuchte, schnitt WAP im Mausmodell schwächer ab (nicht aber in vitro) [Barash 1999].

2. Zielsetzung

Die wichtige Rolle von ABCA3 in der Lunge als Phospholipidtransporter für die Surfactanthomöostase ist mittlerweile bekannt und wird weiterhin näher erforscht. Daneben wird ABCA3 aber auch in anderen Geweben exprimiert, darunter Leber, Niere, Gehirn [Stahlman et al. 2007] und der Milchdrüse [Schimanski 2010].

Phospholipide verfügen über wichtige Eigenschaften in der Milch als Emulgatoren und als protektive Faktoren für das Neugeborene. Es ist nachgewiesen, dass ein Einschnitt in der Phospholipid-Sekretion und eine veränderte Zusammensetzung der Phospholipide in der Milch zu nachteiligen Auswirkungen auf das Neugeborene führen [Isaacs 2005, Buchman 2001, Steven 2000, Hamosh 1999, Carlson 1998, Armand 1996].

Aus einem Pilotprojekt mit ABCA3 heterozygoten Mäusen ergaben sich erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einem ABCA3 Defizit und veränderter Phospholipidzusammensetzung der Mausmilch. Daraus resultierte die Idee, eine konditionale Knock-out Maus für ABCA3 in Mammagewebe zu züchten, diese Mausmilch auf ihren Phospholipidgehalt hin zu analysieren und mögliche Auswirkungen auf die Laktation und das Neugeborene festzustellen. Für dieses ist die Milch die einzige Nahrungsquelle in der ersten Entwicklungsphase.

Diese Arbeit soll die noch gänzlich unbekannte Rolle von ABCA3 in der Milchdrüse aufdecken und näher beschreiben, sowohl im Hinblick auf die Phospholipidzusammensetzung und damit mögliche Substrate von ABCA3, als auch im Hinblick auf die Auswirkungen auf Milchsynthese und –sekretion sowie die Entwicklung der Neugeborenen.

Notwendig waren folgende Schritte:

- Etablierung einer Mauslinie, die mammaspezifisch Abca3 inaktiviert
- Entwicklung einer Melkvorrichtung und Milchgewinnung an drei verschiedenen Zeitpunkten der Laktation
- Messung der Milchmenge
- Phospholipidanalyse der Milch
- Wiegen und Beobachten der Pups
- Analyse des Mammagewebes mit molekularbiologischen Methoden

3. Methoden und Material

3.1. Tierexperimentelle Methoden

Das vorliegende Versuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

3.1.1. Mausezucht

Die Mäuse wurden in dem SPF (special pathogen free) Bereich der zentralen Versuchstierhaltung (ZVH) des Klinikums der Universität München unter Leitung von Dr. Vet. Peter Scheuber gehalten. Durch einzel-belüftete Käfige (IVC-Käfige) und regelmäßige Gesundheitskontrollen von Sentinal-Tieren ist eine pathogenfreie Umwelt garantiert. Es erfolgte ein 4 monatliches Health Monitoring gemäß den FELASA Empfehlungen 2001. Die Untersuchungen wurden von der Gesellschaft für innovative Mikroökologie (GIM), ein zertifiziertes Labor, durchgeführt. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug je 12 Stunden. Futter und Wasser wurde den Mäusen ad libitum zur Verfügung gestellt. Alle Mäuse erhielten das selbe Futter und Wasser. Zum Zeitpunkt des Melkens lagen keine Erkrankungen vor.

Die Verpaarungen erfolgten zunächst weitgehend als permanent monogame Verpaarungen (je ein Weibchen mit einem Männchen). Dadurch, dass das Männchen auch während Geburt und Aufzucht im Käfig bleibt, kann der Post-partum-Östrus des Weibchens ausgenutzt werden. Somit kommt es schneller zu einem weiteren Wurf. Dies ist vorteilhaft, wenn viele Nachkommen aus der gleichen Verpaarung erwünscht sind.

Zur Verpaarung der später zu melkenden Weibchen wurden intermittierende Dreier- bzw. Haremsverpaarungen gewählt. Dabei wurden spätestens nach 15 Tagen die Männchen abgesetzt und auch die Weibchen in Einzelkäfige gesetzt. Somit konnten diese Weibchen während des Melkens nicht erneut schwanger sein und eine eindeutige Zuordnung von Pups zu dem jeweiligen Muttertier zur Bestimmung der exakten Wurfgröße war möglich.

Earclips setzen und Stanzen der Ohren

Im Alter von 6 – 12 Wochen wurden die Mäuse mit einer dafür vorgesehenen 2 mm Loch-Stanze (Modell 292-B; Firma EBECO VTH, Castrop-Rauxel) sowohl zum Zweck der Kennzeichnung, als auch zur Gewinnung von Gewebe zur Genotypisierung nach folgendem Schema gestanzt:

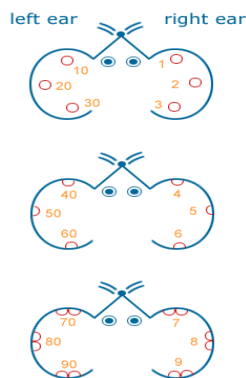


Abbildung 3.1.1-1: Ohrloch-Stanzschema

Dabei wurden die ausgestanzten Ohrgewebestücke in einzelnen 2 ml Eppendofer-Gefäßen gesammelt und zur Genotypisierung (siehe Kapitel 3.2.1) der Mäuse verwendet.

Wiegen der Pups

Im Alter von 5, 10 und 15 Tagen wurde der gesamte Wurf eines gemolkten Weibchens gewogen. Zusätzlich wurde an Tag 15 jedes Pup einzeln gewogen. Die Waage (Modell EMB 2200-0; Firma Koch, Osterhofen-Gergweis). Das Wiegen erfolgte immer zum selben Zeitpunkt, nämlich direkt nach dem Melken des Muttertieres.

3.1.2. Transgene Linien

Folgende Mauslinien wurden zur Zucht verwendet:

- C57/B16J Wildtyp Mäuse
- Transgene Mauslinien:
 - *Abca3*^{+/-} [Hammel 2007]
 - C57/B16-*BLG-cre* (Jackson Laboratories) [Selbert 1998]
 - *Abca3*^{flox/flox} [Besnard 2010]

Der Erbgang dieser aller Merkmale folgt den Mendelschen Regeln.

Die konventionelle *Abca3* Knockout-Maus war bereits von M. Hammel 2007 erstellt worden. Teile von Exon 5 und Exon 7, sowie das gesamte Exon 6 sind durch die IRES-hrGFP-neo Kassetten ersetzt worden [Hammel 2007]. Im Verlauf ist die Neomycin-Kassette mittels *Cre/LoxP*-System wieder herausgekreuzt worden, so dass bei den hier verwendeten Mäusen eine Deletion in Exon 5 – 7 des *Abca3*-Gens vorliegt.

Da homozygote *Abca3*^{-/-} Knockout-Mäuse kurz nach der Geburt an Lungenversagen sterben, wurden keine Heterozygotenverpaarungen angesetzt, bei denen sich Nachkommen im Verhältnis von 1:2:1 (Wildtyp : Heterozygot : Homozygot) ergeben. Heterozygote *Abca3*^{+/-} Mäuse wurden nur mit *Abca3* Wildtyp Mäusen verpaart.

Ziel der Verpaarungen war eine Maus, die in der Brustdrüse kein funktionierendes *Abca3*-Gen mehr hat, beziehungsweise so wenig *Abca3* Expression wie möglich. Dazu wurde folgender Genotyp gezüchtet: *Abca3*^{+/-flox}***BLG-cre***. Hier ist das eine *Abca3* -Allel durch konventionellen Knockout komplett inaktiviert. Das andere *Abca3*-Allel ist von *loxP*-Stellen flankiert und wird in der Anwesenheit der Cre-Rekombinase inaktiviert werden. Damit soll eine vollständigerere Inaktivierung von *Abca3* in der Milchdrüse erreicht werden als es mit dem *Cre-loxP*-System alleine möglich ist. Dazu waren zwei Verpaarungsschritte notwendig. Im ersten Schritt wurde das *BLG-cre*-Gen in die *Abca3*^{+/-}-Linie eingekreuzt. Die so entstandenen Mäuse der ersten Generation (F1 in Tabelle 4) wurden genotypisiert wie in Kapitel 3.2 beschrieben. Davon wurden die Mäuse mit dem Genotyp *Abca3*^{+/-} ***BLG-cre***^{+/-} mit den geflochten Mäusen *Abca3*^{flox/flox} weiterverpaart. Tabelle 4 zeigt die dabei möglichen Genotypen, die aus dieser Verpaarung resultieren können (F2-Generation). Die Maus mit dem gewünschten Genotyp *Abca3*^{+/-flox}***BLG-cre*** hat nun ein *Abca3*-Allel konventionell inaktiviert, das andere Allel von *loxP*-Stellen flankiert und ist in der Lage die Cre-Rekombinase unter dem BLG-Promoter zu exprimieren.

Mit den weiblichen Mäusen dieses Genotyps wurden die Melkversuche durchgeführt im Vergleich zu Wildtyp Wurfgeschwistern.

Tabelle 4: Verpaarungsschema

P	<i>Abca3</i> ^{+/-} <i>Abca3</i> ^{+/+} <i>BLG-cre</i> ^{+/-}			
F1	<i>Abca3</i> ^{+/-}	<i>Abca3</i> ^{+/+}	<i>Abca3</i>^{+/-} <i>BLG-cre</i>^{+/-}	<i>Abca3</i> ^{+/+} <i>BLG-cre</i> ^{+/-}
F1	<i>Abca3</i>^{+/-}<i>BLG-cre</i>^{+/-}			<i>Abca3</i> ^{flox/flox}
F2	<i>Abca3</i> ^{+/-} <i>BLG-cre</i> ^{+/-}	<i>Abca3</i> ^{+/+} <i>BLG-cre</i> ^{+/-}	<i>Abca3</i>^{+/-flox} <i>BLG-cre</i>^{+/-}	<i>Abca3</i> ^{+/+flox} <i>BLG-cre</i> ^{+/-}
	<i>Abca3</i> ^{+/-}	<i>Abca3</i> ^{+/-flox}	<i>Abca3</i> ^{+/+}	<i>Abca3</i> ^{+/+flox}

P = Eltern, F1 = Nachkommen in der ersten Generation, F2 = Nachkommen in der zweiten Generation; die jeweils gewünschten Genotypen sind rot hervorgehoben.

3.1.3. Melken

In der Literatur werden einige wenige Vorrichtungen beschrieben, mit denen Mausmilch gewonnen werden kann [DePeters 2009, Görs 2009, Oskarsson 2004, Kokkalis 1986, Ragueneau 1985]. Keine dieser Vorrichtungen ist kommerziell erhältlich. Deswegen wurde eigens eine spezielle neue Melkvorrichtung entwickelt, die dieses Vorhaben ohne große Belastung für die Tiere und mit möglichst großer Milchausbeute ermöglicht.

In einem Vorversuch des Mäusemelkens mittels einer kleinen Saugpumpe, die rhythmisch an die Mausitzen gehalten wurde, war das Melken zwar möglich, allerdings ergaben sich einige Probleme:

Zum Einen war das Handling der Mäuse nicht optimal. Nach einigen Malen Saugen musste die Maus wieder in den Käfig gesetzt und die gewonnene Milch mit Hilfe einer Spritze aus dem Endstück des Schlauchs der Saugpumpe gezogen werden. Dieser Schritt war notwendig, da sonst nach einiger Zeit der Milchtropfen bis an das Ende des Schlauches in die Pumpe gezogen worden und unwiderruflich verloren gewesen wäre. Dann wurde die Maus erneut festgehalten und es konnte wieder einige Male gesaugt werden. Dieses für Maus und Melker langwierige und stressige Verfahren sollte optimiert werden, so dass ein Melken aller Zitzen ohne Absetzen und Wiedereinfangen der Maus möglich ist.

Zum Anderen gab es erhebliche Schwankungen in der gewonnenen Milchmenge. Das Problem dabei besteht vor allem in dem unausgewogenen Verhältnis von Vormilch zu Nachmilch. Wird nur wenig Milch gewonnen, ist in dieser Probe mehr wässrige Vormilch als fettreiche Nachmilch enthalten. Wird dagegen mehr Milch gewonnen, steigt der Anteil an fettreicher Nachmilch. Dies führt zu einer Inhomogenität und damit schwereren Vergleichbarkeit der Proben. Der exakte Zeitpunkt, wann Vormilch in Nachmilch übergeht ist bei der Maus nicht bekannt.

Ziel war eine Melkvorrichtung, die ein schnelles und unkompliziertes Melken bei gleichzeitig vergleichend hoher Ausbeute ermöglicht. Als Verbesserung der bisherigen Saugpumpe mit Schlauch und kleinem Aufsatz wurde daher eine Flüssigkeitsfalle eingebaut. Die Milch fließt nun direkt in ein Sammelgefäß, das leicht ausgetauscht und verschlossen werden kann. Auch das Endstück kann für jede Maus leicht ausgetauscht werden.

Dennoch empfiehlt sich ein Wechsel des Sammelgefäßes nach circa zwei bis drei Minuten, da die Milch sonst durch den Sog der Pumpe austrocknen kann.

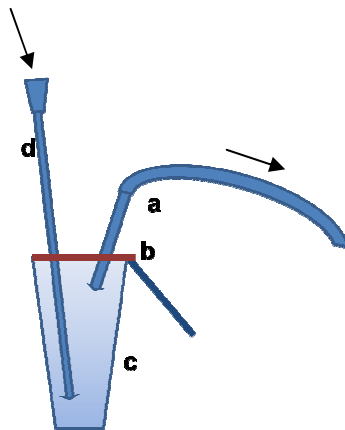
Insgesamt muss die Maus während des Melkvorgangs nun nur noch ein bis zwei Mal zum Wechseln des Sammelgefäßes abgesetzt werden und es ergibt sich eine höhere Milchausbeute mit geringerer Schwankungsbreite der gewonnen Milchmenge pro Maus.

3.1.3.1. Aufbau der Melkvorrichtung

Liste der Bestandteile:

- Saugpumpe (Vakuum Gas Pumpe PM20, VWR Intenational GmbH, Darmstadt)
- Zugehöriger PE-Schlauch
- Tannenbaum als Verbindungsstück (Luer-Lock, Firma Vygon, Aachen)
- Kleiner PVC-Schlauch einer Perfusionsleitung (Durchmesser 1,5 x 2,8 mm) mit Hohnadel am Ende (Kanüle Größe 14 G, Länge 30 mm; BD Medical - Pharmaceutical Systems) [a]
- Deckel eines Eppendorf Gefäßes [b]
- Eppendorf Gefäß (als Sammelbehältnis für die Milch) [c]
- Kanüle als Melkaufsatz (Größe 20G, Länge 40 mm; BD Medical - Pharmaceutical Systems) [d]

Schema:



- a Kleinerer Schlauch mit Hohnadel am Ende*
b Deckel eines Eppendorf Gefäßes
c Eppendorf Gefäß (als Sammelbehältnis für die Milch)
d Kanüle (Größe 20G; als Melkaufsatz)

Abbildung 3.1.3.1-1: Schema der Melkvorrichtung. a-d: siehe Infobox. Pfeile: Richtung des Sogs der Saugpumpe und des Milchflusses



Abbildung 3.1.3.1-2: Foto der Melkvorrichtung

3.1.3.2. Der Melkvorgang

Alle gemolkenen Weibchen waren zum Zeitpunkt des ersten Verpaarungstages zwischen 9 und 12 Wochen alt.

Die Tragzeit von Mäuseweibchen beträgt 21 Tage. Ab dem ersten Verpaarungstag gemessen wurden die Weibchen am jeweils 15. Tag in Einzelkäfig gesetzt. Ab dem 19. Tag nach Verpaarung wurde täglich um dieselbe Zeit kontrolliert, ob das Weibchen geworfen hatte. War dies der Fall, wurde dieser Tag als Tag 1 festgelegt.

Die Milchproduktion und Milchmenge ist wesentlich abhängig von dem Bedarf bzw. der Trinkmenge der Pups [Ragueneau 1985]. Deshalb ist es notwendig die Größe des Wurfs zu normieren, um eine vergleichbare Aussage über die Milchproduktion der Weibchen machen zu können. Dies erfolgte an Tag 1. Die Wurfgröße wurde auf 5 Pups festgelegt.

Die Weibchen wurden jeweils an Tag 5, 10 und 15 gemolken. Genau 2 Stunden vor Beginn des Melkens wurden das jeweilige Weibchen von ihren Pups getrennt und in einen Einzelkäfig gesetzt, so dass für diese Zeit kein Säugen möglich war. In der Literatur sind Zeitspannen von einer und bis zu 18 Stunden Trennung von Muttertier und Pups beschrieben [DePeters 2009, Görs 2009, Oskarsson 2004, Teter 1992, Kokkalis 1986, Ragueneau 1985]. Dabei wird bei bis zu vier Stunden Trennung eine Zunahme der Milchmenge festgestellt. Bei einer Trennungszeit über vier Stunden wurde eine Veränderung des Fettgehalts der Milch beobachtet [Teter 1992]. Daher scheint eine für jeden Melkvorgang standardisierte Trennungsspanne von zwei Stunden ausreichend.

Direkt vor dem Melken wurde jedem Weibchen 0,2 ml 10 IE/ml Oxytocin 10 (Hexal, Holzkirchen) i.p. gespritzt. Oxytocin stimuliert die Milchejektion, indem es eine Kontraktion der myoepithelialen Zellen der Milchdrüse verursacht, ohne die Menge der gebildeten Milch zu beeinflussen [Nishimori 1996].



Abbildung 3.1.3.2-1: Zwei Fotos der Melkvorrichtung in Anwendung

Das Melken selbst erfolgte ebenfalls immer um die selbe Tageszeit, nämlich von 14.00 Uhr bis 15.30 Uhr. Pro Weibchen wurden, soweit möglich, alle Zitzen gemolken.

Die Milchmenge wurde sofort mit einer Pipette (Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg) gemessen. Im Anschluss wurde die Milch pro Maus aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Nachdem alle Proben gesammelt worden waren, wurden sie an das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Leitung Prof. Dr. med. Gerd Schmitz) geschickt. Dort fand die Analyse der Milch mittels Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie (siehe Kapitel 3.4) statt.

3.1.4. Gewebeentnahme

Nach § 10 und § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TSchG) ist Töten zu wissenschaftlichen Zwecken anzeigepflichtig. Diese Anzeigen erfolgten über die ZVH.

An Tag 15 direkt im Anschluss an das Melken wurden bei je 6 Wildtyp- und 6 geflochten Weibchen Milchdrüse, Lunge und Leber für weitere Analysen entnommen. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

3.2.Molekularbiologische Methoden

3.2.1. DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus Ear-/Tailclips

Die Tail- bzw. Earclips der zu genotypisierenden Mäuse wurden zuvor in 150 µl Direkt-PCR-Lysis Reagent (Tail/Ear) der Firma Viagen und 15 µl Poteinase K (0,4 mg/ml; Sigma, Steinheim) lysiert.

Dazu wurden sie bei 55° C über Nacht im Thermomixer (Eppendorf, Hinz Gmbh, Hamburg) inkubiert, anschließend 45 min auf 85°C erhitzt und 10 min abzentifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D / 5417R, Hinz Gmbh, Hamburg).

Die Lagerung zur eventuellen Nachgenotypisierung erfolgte bei -20°C.

DNA-Extraktion aus Mamma-Gewebe

Die Extraktion genomischer DNA aus schockgefrorenem Mammagewebe von je 6 Wildtyp und 6 geflochten Mäusen wurde mit dem PeqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) nach Angaben des Herstellers entsprechend des folgenden Kurzprotokolls durchgeführt:

1. Gewebe (-80°C) in noch gefrorenem Zustand mit Skalpell zerkleinern.
2. 200 μ l TL-Puffer zu dem zerkleinerten Gewebe geben
3. 25 μ l OB-Protease zugeben und vortexen
4. Inkubation bei 55°C im Schüttelwasserbad für 1 – 3 Stunden
5. Zugabe von 20 μ l Rnase A (25 mg/ml) und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur
6. 220 μ l BL-Puffer zum Lysat geben, mischen und vortexen
7. Inkubation für 10 min bei 70°C
8. 220 μ l EtOH abs. Zugeben, mischen und vortexen
9. Gesamten Ansatz auf Säule laden und 1 min mit 8.000x g zentrifugieren
10. 2maliges Waschen mit 750 μ l Waschpuffer (komplettiert mit EtOH) und anschließendem Zentrifugieren für 1 min mit 8.000xx g
11. Säule trocken zentrifugieren für 2 min mit 10.000x g
12. 200 μ l Elutionspuffer (auf 70°C vorgewärmt) direkt auf die Matrix geben
13. 3 min bei Raumtemperatur inkubieren

Nach erfolgter Extraktion wurde die Konzentration der DNA photometrisch mittels Bestimmung der Adsorption bei 260 nm und 280 nm an dem Spektrophotometer „NanoDrop 1000“ (Firma Thermo Scientific) vermessen.

Um dieselbe Ausgangsmenge an DNA für die quantitative PCR zu haben, wurden alle Proben mit Nuclease-Free Water (Promega, Mannheim) auf 22 ng/ μ l verdünnt. Davon wurden je 5 μ l in der qRT-PCR und 1 μ l in der einfachen PCR (siehe Kapitel 3.2.3) eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Aufgrund der geringen gDNA-Ausbeute und dem hohen Fettgehalt in der gDNA-Probe, durch die die anschließende qRT-PCR gestört wurde (siehe Kapitel 3.2.3), wurde zusätzlich ein weiteres Protokoll verwendet, das für Fettgewebe verwendet wird („Isolation of genomic DNA from the organic phase of QIAzol Reagent-lysed fatty tissue samples“ der Firma Qiagen). Da diese Methode jedoch kein besseres Ergebnis brachte, wurde sie wieder verworfen.

3.2.2. RNA-Extraktion und reverse Transkription

RNA-Extraktion

RNA wurde aus 6 Wildtyp- und 6 geflochten Mammagewebeproben extrahiert. Dazu wurden, soweit vorhanden, mindestens 100 mg Mamma-Gewebe (Organentnahme siehe Kapitel 3.1.4) in 500 μ l Trizol (Sigma-Aldrich, Steinheim) an einem Dounce Homogenisator auf Eis aufgeschlossen.

Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0,4 ml Chloroform (Merck, Darmstadt) zugegeben und jede Probe mindestens 15 Sekunden gevortext. Nach weiteren 3 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 min und bei 4°C.

Die obere Phase, die die RNA enthält, wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfer-Tube überführt.

Nach Zugabe von 1 Vol. Isopropanol (Applichem GmbH, Darmstadt) und weiteren 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben ein weiteres Mal bei 12.000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Zu dem verbleibenden Pellet wurden 1,5 ml gekühltes 70% Ethanol (Merck, Darmstadt) zugegeben und die Proben gevortext. Anschließend wurden sie bei 7.500 x g und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen.

Das Pellet wurde nun luftgetrocknet und anschließend für 15 Minuten bei 55°C in 50 μ l ultraPURE Wasser (Quiagen, Hilden) gelöst.

Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Reinigung der RNA und reversen Transkription in cDNA.

RNA Clean-Up

Dieser Schritt ist nötig, um Verunreinigungen und DNA-Reste aus der RNA zu entfernen, bevor sie für weitere Reaktionen verwendet wird. Die Reinigung der RNA erfolgte mittels des RNeasy RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers:

1. 100 μ g RNA (maximale Menge) mit ultraPURE Wasser auf ein Volumen von 100 μ l auffüllen
2. 350 μ l RLT-Puffer dazugeben, mischen
3. 250 μ l EtOH 100% dazugeben, mischen
4. Minisäulen des Kits auf Sammelgefäße setzen und den Reaktionsansatz darauf laden
5. 15 sec bei 8.000x g zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
6. 350 μ l RW1-Puffer zugeben und weitere 15 sec bei 8.000x g zentrifugieren
7. 15 μ l DNase und 70 μ l RDD-Puffer zugeben, mischen

8. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
9. 350 μ l RW1-Puffer zugeben und 15 sec bei 8.000x g zentrifugieren
10. Durchfluss verwerfen und 500 μ l RPE-Puffer zugeben, dann 15 sec bei 8.000x g zentrifugieren
11. Durchfluss verwerfen und weitere 500 μ l RPE-Puffer zugeben, dann 2 min bei 8.000x g zentrifugieren
12. Durchfluss verwerfen und 1 min bei 12.000x g zentrifugieren, danach Minisäule auf neues Sammelgefäß setzen
13. 1 min trocknen lassen und 10 μ l RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Säule geben
14. Nach 1 min für 1 min bei 8.000x g zentrifugieren
15. Schritt 13 und 14 wiederholen
16. Die Lagerung kann bei -80°C erfolgen

Vor und nach der RNA-Reinigung wurde die RNA-Konzentration am Nanodrop vermessen (analog zur Messung der DNA-Konzentration im Unterkapitel DNA-Extraktion aus Mamma-Gewebe).

Reverse Transkription

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde RNA in einer Verdünnung von 100 ng/ μ l verwendet. Dazu wurde die der RNA-Gehalt jeder Probe photometrisch bestimmt (siehe oben) und durch Zugabe von Nuclease-Free Water (Promega, Mannheim) die gewünschte Verdünnung hergestellt. Die reverse Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

1. RNA-Proben zu je 20 μ l für 10 min bei 65°C inkubieren, danach auf Eis ruhen lassen
2. In jede Probe 11 μ l Bulk first-strand reaction mix, 1 μ l Primer pd (N)6 und 1 μ l DTT solution
3. 1 Stunde bei 37°C inkubieren

Die cDNA Proben wurden bei -20°C gelagert. In der qRT-PCR wurde je 1 μ l davon eingesetzt.

3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde erstmals 1984 von Kary Mullis entwickelt [Mullis 1986]. Dafür wurde ihm 1993 der Nobelpreis verliehen.

Diese Methode dient der beliebigen Vervielfältigung einzelner ausgewählter DNA-Abschnitte. Sie besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die sich mehrmals wiederholen, in denen der ausgewählte DNA-Abschnitt verdoppelt wird. Der erste Schritt besteht aus der Strangtrennung

der doppelsträngigen DNA durch kurzes Erhitzen auf 95°C. Darauf folgt im zweiten Schritt die Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge. Primer sind kurze (20-30 Basenpaare) synthetisch hergestellte DNA-Abschnitte, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Die Anlagerung geschieht durch Abkühlen auf eine niedrigere Temperatur. Je nach Primer ist diese Temperatur sorgfältig auszuwählen. Diese sogenannte Annealing-Temperatur hängt von der Länge und dem Gehalt an CG-Basen des Primers ab. Der dritte Schritt ist die DNA-Synthese. Bei 72°C kann die thermostabile Taq-Polymerase die beiden Primer in Richtung der Zielsequenz (von 5' nach 3') verlängern. Durch diese aufeinanderfolgenden Temperaturunterschiede können die drei Schritte beliebig oft wiederholt werden, wobei sich der vorhandene ausgewählte DNA-Abschnitt jeweils verdoppelt. Die Zielsequenz wird somit exponentiell vervielfacht [Berg 2010].

Durch anschließendes Auftragen des Reaktionsgemisches auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel wird das amplifizierte PCR-Produkt sichtbar gemacht.

Bei einer quantitativen Real-time-PCR (qRT-PCR) wird nach jedem einzelnen Zyklus die DNA-Menge durch die Verwendung von in der DNA interkalierenden Farbstoffen (wie zum Beispiel Sybr Green) gemessen. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs verhält sich direkt proportional zur amplifizierten DNA. Je nach DNA-Menge des untersuchten Gens sind mehr oder weniger Reaktionszyklen notwendig, um in die exponentielle Phase der DNA-Amplifikation einzutreten. Es wird ein bestimmter Schwellenwert für die Fluoreszenzintensität (auch Threshold genannt) festgelegt, bei dem für alle Proben die exponentielle Phase beginnt. Wird dieser Schwellenwert erst spät erreicht, war eine hohe Zyklusanzahl notwendig, um die exponentielle Phase zu erreichen. Die wird als sogenannter Ct-Wert angegeben. Je höher der Ct-Wert, umso höher die benötigte Zyklusanzahl und umso weniger Expression des Zielgens. Der Ct-Wert des Zielgens wird immer bezogen auf den Ct-Wert eines Housekeeping Gens, von dem bekannt ist, dass es in allen Zellen eines bestimmten Gewebes konstitutiv, das heißt immer gleich hoch, exprimiert wird. So ist ein Vergleich der DNA-Konzentration verschiedener Proben möglich.

Genotypisierung der Mauslinien mittels PCR

Zur Genotypisierung der Mäuse nach den einzelnen Merkmalen (Heterozygotie für *Abca3*, *Flox*-Allel, sowie *BLG-cre*) wurden jeweils verschiedene Ansätze der Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Auch zum Nachweis der stattgefundenen cre-loxP-Deletion in Mammagewebe erfolgte eine PCR.

Zur Genotypisierung der Mäuse hinsichtlich des *Abca3* Knockout-Allels wurde das Expand Long Template PCR System 2 x 360 U der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Es enthält die thermostabile Long Template Polymerase, die sich speziell für die Amplifikation längerer DNA-Fragmente mit einer Größe bis zu 12kb eignet.

Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung und Flox-Nachweis:

Bezeichnung	Sequenz
Scr-1fneu	5'- GAG CGC TTG TGG ATA TCA CC -3'
Neo-revneu	5'- CAC GGC AAC TGT TGT GAC -3'
Cre Primer BLG f	5'- CCG GAT CCC TAA ACG CCA TCT TCC AGC AGG C -3'
Cre Primer BLG r	5'- AAA CTG TGA TGC CGG TGA ACG -3'
IL2MMforw	5'- CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT -3'
IL2MMrev	5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'
Abca3flox f	5'-AGC ACT TTT CCC TCT CTG GCC TTG AG -3'
Abca3flox r	5'-TGC CCA CCC AGC ACC ATG CT -3'
Abca3gefloxt r	5'-CAAGGGGGCCAATTTTGTATG -3'

PCR-Ansatz Abca3 +/- (NEO-):

Menge	Zusammensetzung
0,6 µl	dNTPs
0,4 µl	Scr-1fneu
0,4 µl	Neo-revneu
2 µl	Puffer 3
0,32 µl	Long Template (Polymerase)
0,6 µl	Magnesiumchlorid
0,7 µl	DNA-Extrakt
14,98 µl	ddH2O

Programm Abca3 +/- (NEO-):

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	94°C	2 min
11x	94°C	30 sec
	53°C	30 sec
	68°C	2 min 20 sec
26x	94°C	30 sec
	59°C	30 sec
	68°C	2 min 20 sec
1x	68°C	10 min
~	8°C	~

PCR-Ansatz BLG-cre:

Menge	Zusammensetzung
0,7 µl	dNTPs
0,4 µl	Cre Primer BLG f
0,4 µl	Cre Primer BLG r
0,7 µl	IL2MMforw
0,7 µl	IL2MMrev
2 µl	Puffer
0,5 µl	Taq-Polymerase
1 µl	DNA-Extrakt
13 µl	ddH2O

Programm BLG-cre:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	94°C	3 min
35x	94°C	30 sec
	52°C	1 min
	72°C	45 sec
1x	72°C	7 min
~	8°C	~

PCR-Ansatz *Abca3-flox*:

Menge	Zusammensetzung
0,6 μ l	dNTPs
0,6 μ l	Abca3flox f
0,6 μ l	Abca3flox r / Abca3gefloxt r
2 μ l	Puffer 3
0,5 μ l	Taq-Polymerase
1 μ l	DNA-Extrakt
14,7 μ l	ddH ₂ O

Programm *Abca3-flox*:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	95°C	5 min
37x	95°C	30 sec
	61,5°C	30 sec
	72°C	40 sec
1x	72°C	7 min
~	8°C	~

Zur Genotypisierung der Mäuse in Bezug auf die Merkmale *Abca3^{flox/flox}* und *BLG-cre* wurde eine Standard-Taq-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Primer sind Tabelle 5 zu entnehmen (Abca3 flox f/r Primer aus [Besnard 2010]; Metabion, Martinsried).

Es wurden 5 μ l Gelloading Solution (Sigma, Steinheim) zugegeben und die Proben auf 1-3% Ethidiumbromid – Agarosegele aufgetragen (siehe Kapitel 3.3).

Quantitative RT-PCR mit gDNA und cDNA

Genomische DNA (extrahiert, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben) und cDNA (siehe Kapitel 3.2.2) wurden mittels quantitativer PCR amplifiziert. Die Primerpaare wurden entsprechend Tabelle 6 verwendet (siehe Tabelle 6: Primer qPCR; teilweise modifiziert nach [Mani 2010] und [Han 2010]).

Dabei wurde auf gleiche Ausgangskonzentrationen der genomischen DNA beziehungsweise cDNA in jedem Reaktionsansatz geachtet. Hierfür wurde der DNA Gehalt wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben gemessen und die Proben anschließend mit Nuclease-Free Water (Promega, Mannheim) auf die gleiche Konzentration von 22 ng/ μ l für die genomische DNA verdünnt. Eine höhere Konzentration war aufgrund der Probenbeschaffenheit (vor allem ihres hohen Fettgehalts) nicht möglich. Für die cDNA Proben war vor dem Umschreiben der RNA in cDNA (siehe Kapitel 3.2.1 Reverse Transkription) die RNA gemessen und jede Probe auf die Ausgangskonzentration von 100 ng/ μ l verdünnt worden.

Um sichergehen zu können, dass keine Verunreinigungen aufgetreten sind, wurde bei jedem Versuchsansatz für jeweils jedes Primerpaar eine Negativkontrolle in Form einer Wasserprobe gemacht. Desweiteren erfolgte die Bestimmung jedes Reaktionsansatzes in dreifacher Ausführung, um die Reproduzierbarkeit des Versuchs zu gewährleisten.

Tabelle 6: Primer qPCR

Bezeichnung	Sequenz
Actinneu f	5'- GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA -3'
Actinneu r	5'- TGG CCT TAG GGT TCA GGG -3'
ABCA3-F-exon5G	5'- CGA CCA CAG CCT TCT CTT TC -3'
ABCA3-R-intron5G	5'- CAG CTG TTA AGC CCC ATC AT -3'
HPRT f	5'- CCT AAG ATG AGC GCA AGT TGA A -3'
HPRT r	5'- CCA CAG GAC TAG AAC ACC TGC TAA -3'
ABCA3 SeqP f	5'- GCATTGCCCTCATTGGAGAGCCTG -3'
ABCA3 SeqP r	5'- TCCGGCCATCCTCAGTGGTGGG -3'
GADPHneu f	5'- TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA -3'
GADPHneu r	5'- TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG -3'
ABCA1 f	5'- AAGAGGCTGCTGATTGCCAGAC -3'
ABCA1 r	5'- GATCTGCACGTACGTCTTCAC -3'
ABCA7 f	5'- AACCACACTGTCCATTTTGAGTG -3'
ABCA7 r	5'- CCACTGTCAGCATATCAAACAG -3'
ABCG1 f	5'- CTGGCAGGATACAGGGAGAC -3'
ABCG1 r	5'- CTCTTTGACCATCTCTCGTCT -3'
SREBP1 f	5'- GTCCAGCAGGTCCCAGTTGT -3'
SREBP1 r	5'- TCCACTCACCAGGGTCTGC -3'
SREBP2 f	5'- TGTCAGTGGAGTCAGGTGCT -3'
SREBP2 r	5'- AATCACCTTTGGCGAGGTCT -3'

Für die quantitative PCR wurde Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) verwendet. Pro Probe wurde ein Mikroliter cDNA eingesetzt. Bei Verwendung von genomischer DNA waren es 5 µl. Die Reaktion fand in einem StepOne Plus Cycler (Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Warrington, UK) statt. Zur Überprüfung wurden die Proben auf ein 3%-iges Agarosegel (siehe Kapitel 3.2.4) aufgetragen.

qRT-PCR-Ansatz Abca3 gDNA:

Menge	Zusammensetzung
0,75 μ l	Primer forward
0,75 μ l	Primer reverse
10 μ l	SybrGreen Master Mix
5 μ l	gDNA
3,5 μ l	ddH ₂ O

Programm gDNA Abca3:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	95°C	3 min
40x	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	40 sec
1x	78°C	2 min
	95°C	1 min
	58°C	30 sec
1x	95°C	10 sec
~	8°C	~

qRT-PCR-Ansatz Abca3 cDNA:

Menge	Zusammensetzung
1 μ l	Primer forward
1 μ l	Primer reverse
10 μ l	SybrGreen Master Mix
1 μ l	cDNA
7,5 μ l	ddH ₂ O

Programm cDNA Abca3:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	95°C	3 min
40x	95°C	30 sec
	62°C	30 sec
	72°C	40 sec
1x	78°C	2 min
	95°C	1 min
	58°C	30 sec
1x	95°C	10 sec
~	8°C	~

Die Auswertung erfolgte mittels der REST-Software (relative expression software tool; Qiagen, TUM München). Dies ist ein Software-Programm, dass einen Algorithmus zum Vergleich der in der qRT-PCR auf ihren Expressionslevel hin untersuchten Gene anwendet. Mit dieser Software ist es möglich anhand der Daten der qRT-PCR die relative Expression von bis zu 16 Proben pro Versuchsgruppe (untersuchtes Gen) und Referenzgruppe (Housekeeping Gen) zu ermitteln [Pfaffl 2002].

3.2.4. Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden je nach Fragmentlänge auf 1 bis 3%-ige Agarosegele aufgetragen. Für ein Gel wurden 1 bis 3 g Biozym LE Agarose Pulver (Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf) in 100 ml TBE-Puffer 10x (Sigma, Steinheim) durch Erhitzen gelöst. Dies wurde mit 5 μ l Ethidiumbromid (10mg/ml; Sigma, Steinheim) versetzt und zum Aushärten in einen Gelträger gegossen. Nach ca. 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur konnte das Gel

verwendet werden. Zu den Proben wurden je 5 μ l Gelloading Solution (Sigma, Steinheim) zugegeben und davon insgesamt 15 μ l auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden nun mit TBE-Puffer als Laufpuffer in einer Gelkammer bei 120 V für eine Stunde elektrophoretisch getrennt (Apelex PS 1006, Evry Cedex). Als Längenstandard wurde ein 100bp oder 1kb Marker (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Die Gele wurden bei 312 nm UV-Durchlicht (Gel iX Imager, Intas GmbH, Göttingen) angeschaut und dokumentiert.

3.2.5. Massenspektroskopie

Die massenspektrometischen Analysen der Phospholipide und des Cholesterins in der Milch wurden freundlicherweise am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerd Schmitz am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

Für die Quantifikation der Milch-Phospholipide wurde die Methode der Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektroskopie mit Hilfe eines Triple Quadrupol Massenspektrometers (Quattro Ultima, Micromass) verwendet.

3.3. Statistische Methoden

Die statistische Datenanalyse der Milch-Analysen erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervall angegeben. Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen wurden durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Bei $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Konditionale Gendeletion von ABCA3 in der Milchdrüse

Da homozygote *Abca3* Knockout-Mäuse direkt nach der Geburt an Lungenversagen sterben [Cheong 2007, Hammel 2007, Fitzgerald 2007], ist es nicht möglich an diesem konventionellen Knockout-Modell die Auswirkungen eines *Abca3*-Defizits für andere Organe zu späteren Zeitpunkten zu untersuchen. Damit wird auch kein Schluss auf die Funktion von *Abca3* in anderen Organen zugelassen. Es scheint, dass heterozygote *Abca3* Knockout-Mäuse in den meisten Organen genügend *Abca3* für eine adäquate Funktion exprimieren oder zumindest über geeignete Kompensationsmechanismen verfügen. So enthalten Lungen heterozygoter Mäuse zwar etwas weniger Phosphatidylglycerin als Wildtyp Tiere, allerdings wurde in Untersuchungen zur Lungenfunktion von heterozygoten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kein signifikanter Unterschied gefunden [Hammel 2007].

In einem Pilotprojekt ergaben sich Hinweise auf eine veränderte Lipidzusammensetzung in der Milch heterozygoter Weibchen im Sinne eines Mangels unterschiedlicher Phospholipidarten im Vergleich zu der Zusammensetzung von Wildtyp-Milch [Hammel 2007]. Um nun herauszufinden, ob *Abca3* eine Rolle für die Milchsekretion und –zusammensetzung spielt, und möglicherweise weiteren Aufschluss über die Substrate von *Abca3* zu bekommen, wurde durch Kreuzung dreier Mauslinien eine für die Milchdrüse konditionale *Abca3* Knockout-Maus generiert.

4.1.1. Kreuzung der Mauslinien und Genotypisierung

Ziel der Kreuzungen waren Mausweibchen, die ausschließlich in der Milchdrüse keinen funktionsfähigen *Abca3*-Transporter mehr exprimieren können. In der Lunge muss gleichzeitig mindestens Heterozygotie für *Abca3* vorliegen, um eine gute Lungenfunktion zu gewährleisten. Um dies zu erreichen wurde in *Abca3* heterozygote Mäuse das *Cre-loxP*-System eingekreuzt. Der genaue Mechanismus dieses Systems ist in Kapitel 1.4.1 ausführlich erläutert.

Zu Beginn standen zusätzlich zu den C57/Bl6J Wildtyp Mäusen drei verschiedene transgene Mauslinien zur Verfügung (siehe auch Kapitel 3.1.2): *Abca3*^{+/-} [Hammel 2007], C57/Bl6-*BLG-cre* (Jackson Laboratories) [Selbert 1998] und *Abca3*^{flx/flx} [Besnard 2010].

Die Mäuse wurden, wie in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben, in zwei Schritten verpaart und die Nachkommen nach Setzen der Ohrlochstanze (siehe Kapitel 3.1.1) anhand dieser mittels PCR genotypisiert (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.3). Insgesamt waren drei PCRs hinsichtlich der drei gewünschten Genmerkmale zur vollständigen Genotypisierung notwendig:

Zum Einen die PCR, um den konventionellen *Abca3*-Knockout nachzuweisen. Das Gelbild der zugehörigen PCR ist in Abbildung 4.1.1-1 zu sehen. Das rekombinante „ausgeknockte“ *Abca3*-Allel ist durch Deletion um 358 Basenpaare kürzer als der Wildtyp-Genlocus, so dass sich für heterozygote Tiere zwei PCR-Fragmente ergeben: Eine bei 2281 bp für das Wildtyp-Allel und eine bei 1923 bp für das rekombinante Allel.

Zum Anderen wurde bezüglich des geflochtenen *Abca3*-Allels genotypisiert. Dazu wurden Primer gewählt (siehe Tabelle 5, Kapitel 3.2.3), die jeweils vor beziehungsweise nach der ersten *loxP*-Stelle liegen (siehe hierzu auch Schema 4.1.2-1 Primer a und b). Ist auf einem der *Abca3*-Allele eine *loxP*-Stelle vorhanden, ergibt sich eine zweite 76 bp größere Bande bei 450 bp zusätzlich zu der eigentlichen Wildtyp-Bande bei 374 bp, wie das Elektrophoresebild der PCR Abbildung 4.1.1-2 zeigt.

Zum Dritten musste nachgewiesen werden, dass sie die cre-Rekombinase unter dem milchdrüsenpezifischen oBLG-Promoter besitzen. Hierzu war eine weitere PCR (siehe 3.2.3) notwendig, die ein 190 bp langes Produkt ergibt, wenn das zugehörige Gen der Cre-Rekombinase vorliegt. Als Positivkontrolle wurden Primer im *Interleukin 2* Gen gewählt (Bande bei 324 bp, siehe Abbildung 4.1.1-3).

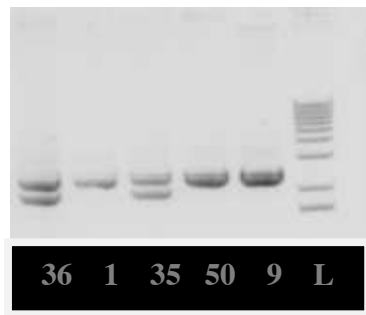


Abbildung 4.1.1-1: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der NEO-PCR zur Genotypisierung der Mäuse hinsichtlich *Abca3*^{+/−} Heterozygotie. 1%-Agarosegel; Die kleinere Bande bei 1923 bp markiert das veränderte Allel. L: 1 kbp-Ladder zur Bestimmung der Fragmentgröße; 36: Maus #36 (*Abca3*^{+/−}); 35: Maus #35 (*Abca3*^{+/−}); 1, 9, 50: Mäuse #1, 9, 50 (Wildtyp). Der homozygote Genotyp *Abca3*^{−/−} kommt wegen des gewählten Verpaarungsschemas nicht vor (siehe Kapitel 3.1.1).

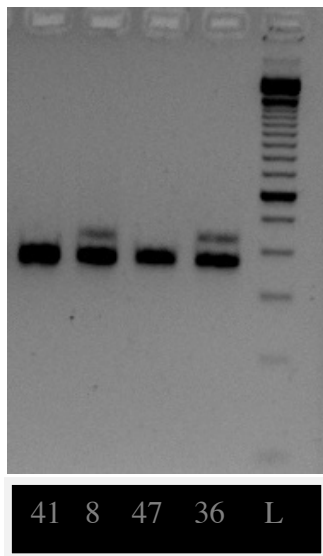


Abbildung 4.1.1-2: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der Flox-PCR zur Genotypisierung der Mäuse. 3%-Agarosegel; L: 100 bp-Ladder ; 41, 47: Mäuse #41 und #47 (kein gefloxtes *Abca3*-Allel vorhanden); 8, 36: Mäuse #8 und #36 (gefloxtes Allel vorhanden entsprechend der größeren Bande bei 450 bp).

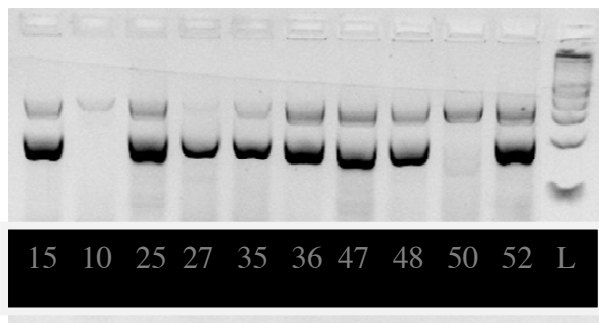


Abbildung 4.1.1-3: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der BLG-cre-PCR zur Genotypisierung der Mäuse. 3%-Agarosegel; L: 100 bp-Ladder; 15, 25, 27, 35, 36, 47, 48, 52: Mäuse mit den entsprechenden Nummern (BLG-cre vorhanden bei 190 bp); 10, 50: Mäuse #10 und #50 (kein BLG-cre nachweisbar, die Bande bei 324 bp entspricht der Positivkontrolle für IL-2).

Im Ergebnis resultierten aus den angesetzten Verpaarungen 16 Weibchen mit dem gewünschten Genotyp *Abca3*^{+/-flox}**BLG-cre**, von denen 15 im Vergleich zu den 13 weiblichen Wildtyp-Wurfgeschwistern gemolken werden konnten.

Zusammengefasst ergibt sich nun folgende Konstellation: Die Weibchen des Melkversuchs mit dem Genotyp *Abca3*^{+/-flox}**BLG-cre** besitzen in allen Zellen ein „ausgeknocktes“ *Abca3*-Allel und ein intaktes *Abca3*-Allel, das aber Exon 4 - 7 von *loxP*-Stellen flankiert hat (siehe Abbildung 4.1.2-1), das sogenannte gefloxt Allel. Zusätzlich sind diese Weibchen in der

Lage bei Aktivierung des oBLG-Promoters die Cre-Rekombinase zu exprimieren. Der oBLG-Promoter ist nur in Milchdrüsenzellen während der Laktation aktiv [Selbert 1998], so dass die Cre-Rekombinase auch nur zu diesem Zeitpunkt in diesen Zellen vorhanden ist. Sie hat die Eigenschaft, an den *loxP* Stellen des geflochtenen Allels anzusetzen, und katalysiert die DNA Rekombination zwischen zwei *loxP* Stellen [Sauer 1998]. Damit wird der Teil des geflochtenen *Abca3*-Allels, der zwischen den *loxP*-Stellen liegt, herausgeschnitten. Somit ist in den Milchdrüsenzellen - und nur dort - auch das zweite *Abca3*-Allel inaktiviert.

4.1.2. Flox-Nachweis mittels genomischer DNA

Um auf genomischer Ebene nachzuweisen, dass das *Cre/LoxP*-System in den Milchdrüsenzellen der Versuchsgruppe funktioniert hat, die gewünschte Deletion in Milchdrüsenepithelzellen also tatsächlich vorliegt, wurde an Tag 15 der Laktation nach dem letzten Melkvorgang je sechs Wildtyp Weibchen und sechs Weibchen des Genotypes *Abca3^{+/-} flox^{BLG-cre}* Mammagewebe entnommen (siehe Kapitel 3.1.4). Aus diesem wurde gDNA isoliert (siehe Kapitel 3.2.1) und in eine PCR eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.3).

Abbildung 4.1.2-1 zeigt schematisch die Lage der Primer für diese PCR (genaue Angaben der Primer siehe Tabelle 5, Kapitel 3.2.3). Während zur Genotypisierung nur das Vorhandensein von *loxP* Stellen nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.1.1) mittels der Primer a und b, sollte nun der Nachweis erfolgen, dass die Cre-vermittelte Rekombination der *LoxP* Stellen stattgefunden hat und damit im Mamma-Gewebe kein intaktes *Abca3*-Allel mehr vorliegt. Dazu wurden in dieser PCR Primer a und c eingesetzt. Im Falle der gelungenen Exzision des „geflochten“ (von *LoxP*-Stelle flankierten) Abschnitts ergibt die PCR ein 450 bp großes Produkt. Dieses konnte im Mammagewebe aller sechs Weibchen der Versuchsgruppe gezeigt werden (siehe Abbildung 4.1.2-2), nicht jedoch im Wildtyp-Mammagewebe. Theoretisch würden Primer a und c beim Wildtyp oder in Zellen, in denen das Floxen nicht stattgefunden hat, ein 4940 bp großes Produkt und für den Genotyp *Abca3^{+/-}* ein zusätzliches Produkt der Größe 4582 bp ergeben. Derart große DNA-Fragmente sind in einer normalen PCR auch bei Verwendung einer geeigneten Taq-Polymerase und eines speziellen Programms nicht amplifizierbar.

Das *Cre-LoxP*-System hat damit nachweislich im Mammagewebe der „geflochten“ *Abca3^{+/-} flox^{BLG-cre}* Weibchen funktioniert. Das heißt, es hat eine konditionale Deletion von *Abca3* im Mammagewebe stattgefunden. Diese Methode trifft aber noch keine Aussage darüber, wie hoch die Effektivität dieses Systems war. Darauf wird im nächsten Kapitel eingegangen.

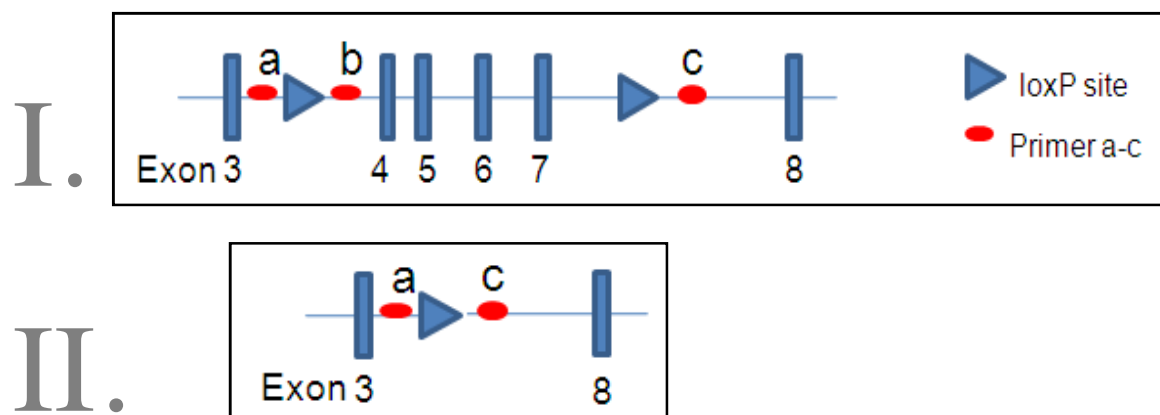


Abbildung 4.1.2-1: Schematischer Ausschnitt aus dem geflochten *Abca3*-Allel. Vertikale Balken: Exon 3–8; Dreiecke: *LoxP*-Stellen; Rote Punkte: Lokalisation der Primer. I. Schematische Darstellung des geflochten Allels vor Anwesenheit der Cre-Rekombinase. II. Schematische Darstellung des geflochten Allels in Anwesenheit der Cre-Rekombinase. Diese katalysiert die Rekombination zwischen zwei *LoxP*-Stellen. Das resultiert in der Exzision des dazwischenliegenden DNA-Abschnitts. In diesem Fall führt das zu einer Deletion von Exon 4 – 7 des *Abca3*-Gens. Zum genauen Mechanismus der *Cre-LoxP*-Interaktion siehe Kapitel 1.4.1.

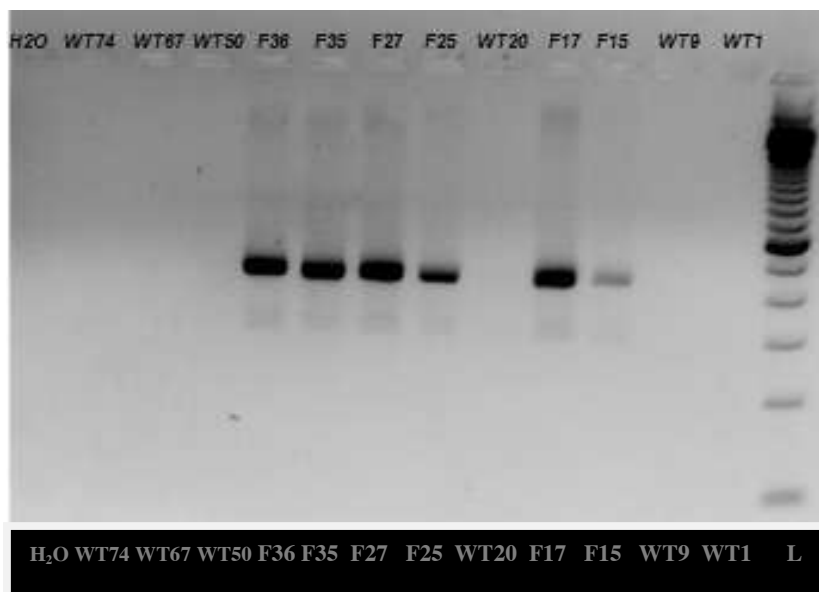


Abbildung 4.1.2-2: Gelbild der PCR zum Nachweis des Floxens (Verwendung von gDNA aus Mammagewebe). 3%-Agarosegel; L: 100 bp Ladder; WTx steht für Wildtyp, Fx steht für gefloxt. Flox: Bande bei 450 bp sichtbar; WT: keine Bande sichtbar, da theoretisches Produkt zu lang (Bande wäre theoretisch für WT bei 4940 bp und für *Abca3*^{+/-} : zusätzliche Bande bei 4582 bp).

4.1.3. Quantitative Bestimmung des Expressionslevels für ABCA3

Die quantitative Bestimmung der Expression von *Abca3* erfolgte mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 3.2.3). Mit dieser Methode ist es möglich die Menge an vorhandener DNA im Vergleich zu einer anderen Probe zu messen.

Es war leider nicht möglich genomische DNA mittels qRT-PCR zu quantifizieren, da Mammagewebe eine sehr fetthaltige Gewebeart ist. Die Effektivität und Aussagekraft der qRT-PCR wird durch den hohen Fettanteil in der Probe stark eingeschränkt. Trotz verschiedener Versuche, das Fett aus den DNA-Proben zu eliminieren oder die Proben anders aufzubereiten (siehe Kapitel 3.2.2), gelang es nicht, nach Ausschluss aller anderen möglichen Störfaktoren eine aussagekräftige qRT-PCR für gDNA zu generieren.

Um auf mRNA Ebene zu zeigen, dass *Abca3* im Mammagewebe ausgeschaltet wurde, wurde aus dem an Tag 15 der Laktation entnommenen Mammagewebe (siehe Kapitel 3.1.4) auch RNA extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels RT-PCR analysiert (siehe Kapitel 3.2). Die für diese PCR verwendeten Primer (siehe Tabelle 6 Kapitel 3.2) liegen Exon übergreifend, so dass es nicht möglich ist genomische DNA mit zu amplifizieren. Sie ergeben ein Produkt der Größe 177 bp. Als Housekeeping-Gene wurden GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; Produktgröße 186 bp), Actin (234 bp) und HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase; Produktgröße 102 bp) gewählt. Es wurde auf die gleiche Menge an eingesetzter cDNA in jeder Probe geachtet.

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit Hilfe der REST-Software ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.3). Dabei ergab sich, dass im Milchdrüsengewebe der geflochten Mäuse das *Abca3*-Gen um 95% reduziert ist im Vergleich zum Wildtyp. Die genauen Werte sind Tabelle 7 zu entnehmen. Abbildung 4.1.3-1 zeigt den relativen mRNA-Level von *Abca3* bezogen auf das Housekeeping-Gen *HPRT* in Wildtyp-Mammagewebe und geflochtenem Mammagewebe.

Tabelle 7: Quantitative Expressionslevel von *Abca3* mRNA im Mammagewebe von Wildtyp Mäusen und geflochten Mäusen

Genotyp	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum	p-Wert
WT	1,0325	0,36	1,05	0,62	1,41	0,006
Flox	0,0540	0,02	0,05	0,03	0,08	

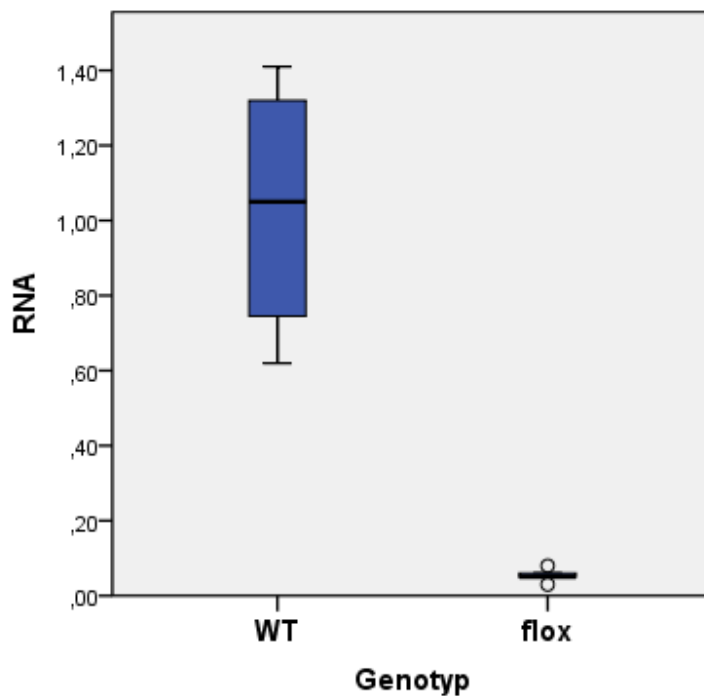


Abbildung 4.1.3-1: Relative mRNA-Level von *Abca3* bezogen auf das Housekeeping-Gen *HPRT* in Wildtyp-Mammagewebe und gefloxtem Mammagewebe.

4.1.4. Quantitative Bestimmung der Expressionslevel weiterer Gene

Zusätzlich zu *Abca3* wurden auch die Expressionslevel weiterer Gene auf Ebene der mRNA im Mammagewebe mittels RT-PCR untersucht.

Diese Gene stehen alle in Zusammenhang mit ABCA3. Zum Teil sind sie in die Regulation der Expression von ABCA3 involviert, wie SREBP1 und SREBP2 (Sterol response element binding protein) [Matsuzaki 2008, Besnard 2007]. Zum Teil sind sie verwandte Transporter, die ähnliche Aufgaben erfüllen wie ABCA3 und zum Beispiel durch Hochregulierung den Ausfall von ABCA3 kompensieren könnten. Dazu gehören die ABC-Transporter ABCA1, ABCA7 und ABCG1 [Mani 2010].

Tabelle 8: Relative Genexpression von *Abca1*, *Abca7*, *Abcg1*, *Srebp1*, *Srebp2*

Gen	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	p-Wert
<i>Abca1</i>	1,0	1,060	0,238 - 10,468	0,030 - 16,715	0,901
<i>Abca7</i>	1,0	0,923	0,751 - 1,149	0,686 - 1,247	0,661
<i>Abcg1</i>	1,0	1,146	0,000 - 2,753,5	0,000 - 14,898	0,899
<i>Srebp1</i>	1,0	0,954	0,012 - 111,52	0,003 - 218,51	0,922
<i>Srebp2</i>	1,0	1,799	0,856 - 3,957	0,710 - 4,620	0,341

Die Auswertung der RT-PCR mittels der REST-Software bezüglich dieser Gene ergab zwischen Wildtyp Gewebe und gefloxtem Mammagewebe keine statistisch signifikanten Ergebnisse (siehe Tabelle 8).

4.2.Optimierung des Melkvorgangs

Jeweils 15 gefloxt Weibchen und 13 Wildtypweibchen wurden mit der in Kapitel 3.1.3.1 ausführlich dargestellten Melkvorrichtung je drei Mal gemolken, nämlich an Tag 5, 10 und 15 der Laktation. Der Melkvorgang erfolgte wie in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben.

Es wurde dabei genau auf gleiche Versuchsbedingungen geachtet. Die Mäuse wurden im SPF-Bereich der ZVH gehalten und erhielten alle dasselbe Futter und Wasser (siehe Kapitel 3.1.1). Die Wurfgröße betrug für jeden Wurf ab Tag 1 fünf Pups. Die Normierung der Wurfgröße war notwendig, da die Menge der pro Weibchen produzierten Milch von der Anzahl der säugenden Pups abhängt [Ragueneau 1985]. Jedem Weibchen wurde direkt vor dem Melken 0,2 ml 10 IE/ml Oxytocin 10 intraperitoneal gespritzt. Oxytocin stimuliert die Milchejektion ohne die Menge der gebildeten Milch zu beeinflussen [Nishimori 1996]. Die Weibchen wurden immer zur selben Zeit für zwei Stunden vor dem Melken von ihren Pups getrennt. Außerdem erfolgte auch der Melkvorgang für alle Weibchen immer zur selben Tageszeit. Es wurden soweit möglich alle Zitzen gemolken. Die verwendete Saugpumpe wurde nicht gewechselt. Nur der Aufsatz und das Sammelgefäß wurden pro Weibchen ausgetauscht. Damit sollten folgende mögliche unerwünschten Einflussfaktoren ausgeschlossen werden: Durch die Wurfgröße bedingte Unterschiede oder tageszeitlich bedingte Schwankungen in der Milchproduktion, eine Melkausbeute, die durch unterschiedliche Oxytocindosierungen zustande gekommen ist, sowie eine Melkausbeute, die auf unterschiedlicher Sogstärke verschiedener Pumpen beruht.

Mäuseweibchen säugen ihre Pups kontinuierlich. Daher ist eine Trennung des Weibchens von dem Wurf vor dem Melken notwendig, damit sich Milch in den Ausführungsgängen der Milchdrüse ansammeln kann, die dann abgemolken wird. Um eine vergleichbare Aussage über die Milchproduktion und -menge treffen zu können, betrug der Zeitraum der Trennung immer zwei Stunden. Eine längere Zeit wird nicht empfohlen, da sich die Milchdrüse nur füllen, ein schmerzhafter Milchstau - sowie ein Hungern der Pups vermieden werden soll. Bei einer Trennungsdauer von mehr als vier Stunden wurde zudem über Veränderungen der Fettzusammensetzung der Milch berichtet [Teter 1992]. Die Ergebnisse zu Laktation und Milchmenge werden in den folgenden Kapiteln 4.4 und 4.4.1 beschrieben. Das Melken wurde von den Weibchen im Allgemeinen gut toleriert.

Des Weiteren sollte die Milchausbeute für jeden Melkvorgang möglichst hoch sein. Wird der Melkvorgang frühzeitig abgebrochen, so besteht die Gefahr, dass dies Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Milch, vor allem in Bezug auf ihren Fettgehalt, hat. Dies hängt mit dem Verhältnis von Vormilch zu Nachmilch zusammen. Die erste Milch, Vormilch genannt, ist wässriger als die eher fettreiche Nachmilch. Wird also durch technisch bedingte Probleme

beim Melkvorgang zu wenig Milch gewonnen, ist der Anteil an fettreicher Nachmilch niedriger als in anderen Proben. Dies führt zu einer Inhomogenität und damit schwereren Vergleichbarkeit der Milchezusammensetzung. Der exakte Zeitpunkt, an dem Vormilch in Nachmilch übergeht, ist bei der Maus nicht bekannt. Daher wurde das Melksystem des Pilotversuchs (Beschreibung siehe Kapitel 3.1.3) wie in Kapitel 3.1.3.1 gezeigt erweitert. Im Folgenden sollen die Neuerungen und die dadurch erreichte Optimierung des Systems näher erläutert werden.

Das größte Problem des ersten Melksystems bestand darin, dass der Melkaufsatz direkt mit dem zur Saugpumpe führenden Schlauch in Verbindung stand. Dadurch konnte es passieren, dass der sich im Melkaufsatz angesammelte Milchtropfen plötzlich löste und durch den Schlauch bis in die Pumpe gezogen wurde. Auf diese Weise verlorengegangene Milch ging nicht in die weitere Auswertung ein. Um dies zu vermeiden, musste mehrmals das Melken unterbrochen werden, das Weibchen in den Käfig zurückgesetzt werden und der Milchtropfen mit einer Spritze aus dem Melkaufsatz gezogen werden. Danach konnte der Melkvorgang wieder fortgesetzt werden. Daraus ergab sich eine lange Melkdauer und durch das häufige Wegsetzen und wieder Einfangen für die Mäuse relativ viel Stress. Auch Stress kann sich negativ auf die Milchausbeute auswirken [DePeters 2009].

Diese oben genannten Gründe führten zu der Idee eine Flüssigkeitsfalle zwischen Melkaufsatz und Schlauch der Saugpumpe zwischenschalten. Ähnliche Melkvorrichtungen wurden in der Literatur bereits beschrieben [DePeters 2009, Oskarsson 2004]. Der genaue Aufbau der neuen Melkvorrichtung ist Kapitel 3.1.3.1 zu entnehmen. Das System besteht aus einfachen Laborutensilien, die in jedem Labor vorhanden sind: 2 ml Eppendorfer Gefäße (als Sammelbehälter für die Milch) und Kanülen der Größe 20G als Melkaufsätze, sowie ein abgeschnittener zusätzlicher Deckel eines Eppendorfer Gefäßes, der mit der Kanüle durchstochen werden kann. Sowohl die Melkaufsätze als auch die Sammelgefäße sind so bei Bedarf leicht austauschbar. Damit war es zum Einen möglich längere Zeit mehrere Zitzen zu melken ohne Milch zu verlieren. Zum Anderen befand sich die Milch am Ende des Melkvorgangs direkt in dem Sammelgefäß und musste nicht mehr umgefüllt werden.

Insgesamt ergab sich damit ein leichteres stressfreieres Handling der Mäuse, eine kürzere Melkdauer bei höherer Milchausbeute und weniger technisch bedingten Schwankungen.

Dennoch konnte es nicht vermieden werden, das Weibchen ein bis zwei Mal während des Melkens abzusetzen, um das Sammelgefäß auszutauschen. Dies war nötig, da nach ungefähr zwei bis drei Minuten die Milch beginnt durch den Luftstrom der Saugpumpe auszutrocknen.

4.3. Mamma und Laktation

Alle Weibchen, sowohl Wildtypen als auch gefloxt Mäuse, waren in der Lage trächtig zu werden und ihren Wurf auszutragen. Phänotypisch war kein Unterschied zwischen ihnen

erkennbar. Sie entwickelten alle soweit unauffällige funktionsfähige Milchdrüsen, waren in der Lage ihre Pups zu säugen und konnten auch, wie zuvor beschrieben, gemolken werden.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen ergaben sich keine Unterschiede in Bezug auf die ursprüngliche Wurfgröße und Anzahl der milchgebenden Zitzen (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

Die Anzahl der ursprünglich geworfenen Pups wurde an Tag 1 festgestellt. Daraufhin wurde die Wurfgröße auf fünf Pups normiert, um eine vergleichbare Stimulation der Milchproduktion zu erhalten. Diese hängt mit der Anzahl der säugenden Nachkommen und Dauer des Säugens zusammen. Pups stimulieren durch den Vorgang des Säugens die Milchproduktion und Ausschüttung. Diese ist umso höher, je mehr säugende Pups da sind. Eine vergleichende Aussage über die Milchmenge kann somit nur bei gleicher Wurfgröße getroffen werden. [Ragueneau 1985]

Es wurden wenn möglich alle Zitzen der Weibchen gemolken (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl der gemolkenen Zitzen

Gruppe	n	Mittelwert	SD	Median	p-Wert
Gesamt	28	6,75	0,93	7	n.s.
WT	13	6,62	1,12	7	n.s.
Flox	15	6,87	0,74	7	n.s.

Tabelle 10: Anzahl der geworfenen Pups

Gruppe	N	Mittelwert	SD	Median	p-Wert
Gesamt	28	7,89	1,95	8	n.s.
WT	13	8,38	1,56	8	n.s.
Flox	15	7,47	2,20	8	n.s.

4.3.1. Milchmenge

Das Melken der Weibchen erfolgte, wie in 3.1.3 beschrieben, an Tag 5, 10 und 15 nach Geburt der Pups. Dabei wurde sorgfältig auf exakt gleiche Bedingungen geachtet: Das Absetzen der Pups erfolgte immer zwei Stunden vor dem Melken um dieselbe Tageszeit (12.00 Uhr mittags), ebenso wie der Melkvorgang (14.00 Uhr bis 15.30).

Als Tag 1 der Laktation wurde der Tag der Geburt der Pups festgelegt, sofern das Weibchen bis 16.00 Uhr geworfen hatte. Die Wurfgröße wurde auf 5 Pups festgelegt. Der erste Melkdurchlauf erfolgte an Tag 5 der Laktation. Dieser Tag bietet sich an, da Weibchen und Pups Zeit hatten, sich an die neue Situation zu gewöhnen, und die Laktation sich in einem kontinuierlichen Anstieg befindet [Kokkalis 1986, Jara-Almonte 1972]. Der zweite Melkdurchlauf fand an Tag 10 statt. An diesem Tag findet sich auch laut Selbert et al. die höchste Gendelektion durch das loxP/cre-System [Selbert 1998]. Die Laktation steigt immer noch an, allerdings nicht mehr in dem Maß wie an Tag 5. Der dritte Melkdurchlauf erfolgte an Tag 15. Zu diesem Zeitpunkt hat die Milchproduktion ihren Peak erreicht bis leicht überschritten. Nach Tag 15 sind die Pups in der Lage, die Nahrung der Mutter zu sich zu nehmen, und werden zunehmend unabhängig von der Milch der Mutter [Ragueneau 1985]. Daher wurde nur bis Tag 15 gemolken und das Gewicht des Wurfs kontrolliert (Gewicht siehe Kapitel 4.3.2).

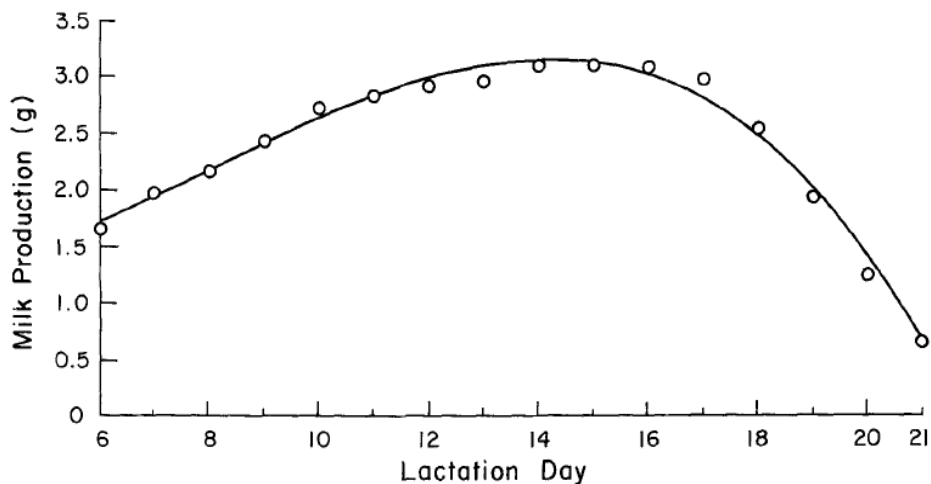


Abbildung 4.3.1-1: Laktationskurve von Mäusen aus [Jara-Almonte 1972]: Maximale Milchproduktion an Tag 14 – 15 mit 3 g, ermittelt durch Wiegen des Wurfs vor und nach dem Säugen.

Abbildung 4.3.1-1 zeigt die Laktationskurve von Mäusen. Diese wurden durch längere Trennung der Pups von der Mutter und anschließendes Säugen mit Gewichtskontrollen des Wurfs vor und nach dem Säugen ermittelt [Jara-Almonte 1972]. Sie gibt einen groben Überblick über die Verteilung der Höhe Milchproduktion während der 21 Tage der Laktation.

Ob diese Kurve bezüglich der absoluten Höhe der Milchproduktion vergleichbar ist mit den Werten dieser Studie, ist fraglich. Denn die Milchproduktion ist von vielen verschiedenen Faktoren, wie unter anderem Mausstamm, Zusammensetzung der Nahrung und Wurfgröße, abhängig. Des Weiteren ist umstritten, ob diese Methode des Wiegens geeignet ist, um die

absolute Höhe der Milchproduktion zu ermitteln. Sie zeigt aber exemplarisch den Verlauf der Milchproduktion bei Mäusen.

Sofort nach dem Melken wurde das Volumen der Milch mit Hilfe einer Pipette gemessen und dokumentiert. Dabei zeigte sich für die 13 Wildtypen ein kontinuierlicher Anstieg der Milchmenge von Tag 5 bis Tag 15 auf das Doppelte, vergleichbar mit dem Verlauf der Laktationskurve von Jara-Almonte 1972 (siehe Abbildung 4.4.1-1).

Tabelle 11: Milchmenge in μ l

Gruppe		N	Mittelwert	SD	95% CI	p-Wert
Tag 5	WT	13	103,85	64,43	64,91-142,78	n.s.
	Flox	15	91,33	62,92	56,49-126,18	
Tag 10	WT	13	145,77	71,03	102,85-188,69	n.s.
	Flox	15	151,67	66,65	114,76-188,57	
Tag 15	WT	13	212,69	140,69	127,67-297,71	0,005
	Flox	15	99,67	75,65	57,77-141,56	

Bei den geflochten Weibchen zeigte sich von Tag 5 auf Tag 10 ebenfalls ein mit dem Wildtyp vergleichbarer Anstieg der Milchmenge. An Tag 15 aber fällt die Milchmenge der *Abca3*-defizienten Weibchen dramatisch unter den Wert von Tag 10 ab und erreicht nur in etwa die Menge, die an Tag 5 produziert wurde. Das entspricht weniger als der Hälfte der Milchproduktion der Wildtyp-Weibchen an Tag 15 (Abbildung 4.3.1.-2) und damit einer signifikanten Reduktion der Milchmenge in der Flox-Gruppe an Tag 15 im Vergleich zur Wildtyp Gruppe ($p = 0,005$). Die genauen Werte sind Tabelle 11 zu entnehmen.

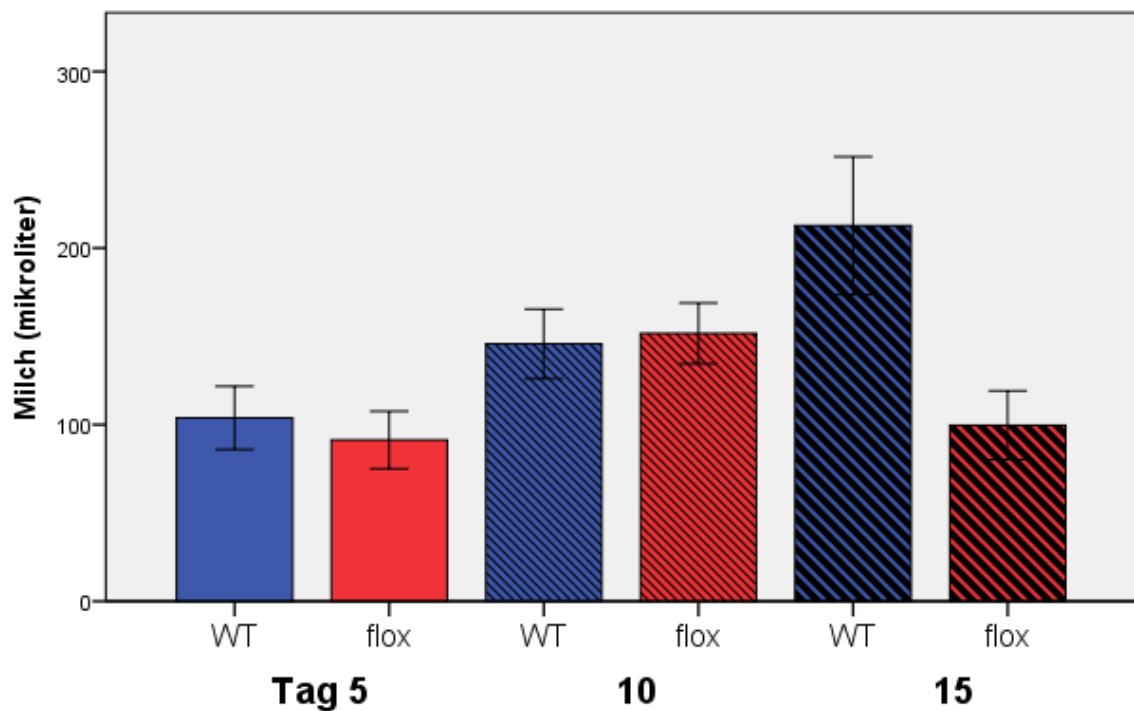


Abbildung 4.3.1-2: Milchmenge in μl . Blaue Balken: Wildtyp, rote Balken: Versuchsgruppe der *Abca3*-defizienten Mäuse. Ohne Schraffierung: Milchmenge an Tag 5, dünne Schraffierung: Milchmenge an Tag 10, dicke Schraffierung: Milchmenge an Tag 15.

4.3.2. Gewicht der Pups

An je 4 verschiedenen Tagen (Tag 2, 5, 10 und 15) wurde der gesamte Wurf eines Weibchens gewogen (siehe Kapitel 3.1.1). Insgesamt waren es die Würfe von 13 Wildtyp-Weibchen und 15 Flox-Weibchen. Dabei ergab sich an allen Tagen ein durchschnittlich geringeres Gewicht bei den Nachkommen der *Abca3*-defizienten Weibchen. Diese Werte hatten jedoch eine hohe Streuung und erreichten keine Signifikanz. Sie liegen in beiden Versuchsgruppen im altersgerechten Durchschnitt für C57/Bl6 Mäuse [Jara-Almonte 1972].

Nach Tag 15 erfolgte keine Messung des Gewichts mehr, da durch diese keine Aussage über die Milch des Muttertieres zu erwarten wäre. Das ist deshalb der Fall, da ab Tag 15 die Pups eigenständig die Nahrung der Mutter fressen können und sie somit nicht mehr von der Muttermilch abhängig sind [Jara-Almonte 1972, Kokkalis 1986].

Tabelle 12: Gewicht des Wurfes in Gramm an Tag 2, 5, 10 und 15

Gruppe		N	Mittelwert	SD	95% CI	p-Wert
Tag 2	WT	13	7,38	1,33	6,58-8,19	n.s.
	Flox	15	7,20	1,21	6,53-7,87	
Tag 5	WT	13	14,77	1,79	13,69-15,85	n.s.
	Flox	15	14,13	2,17	12,93-15,33	
Tag 10	WT	13	28,08	3,07	26,22-29,93	n.s.
	Flox	15	27,20	3,38	25,33-29,07	
Tag 15	WT	13	36,77	3,00	34,95-38,58	n.s.
	Flox	15	34,67	4,95	31,92-37,41	
Gesamt	WT	39	26,54	9,53	23,45-29,63	n.s.
	Flox	45	25,33	9,31	22,54-28,13	

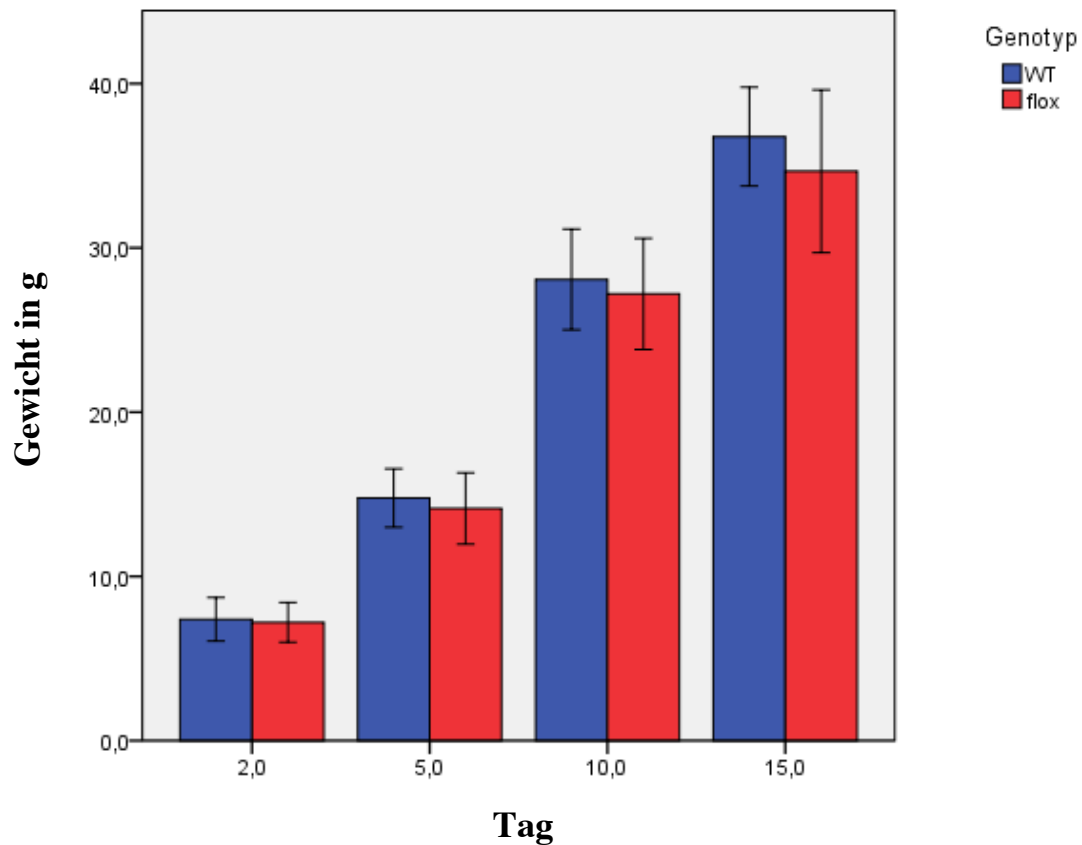


Abbildung 4.3.2-1: Gewicht des Wurfes an Tag 2, 5, 10 und 15. Blaue Balken: Wurf der Wildtyp-Weibchen, rote Balken: Wurf der *Abca3*-defizienten Weibchen.

4.4. Lipidanalyse der Milch

Es ist bekannt, dass ABCA3 ein Lipidtransporter in der äußeren Membran der Lamellarkörperchen in Typ II Pneumozyten der Lunge ist (siehe Kapitel 1.3). Aufgrund der aus der Lunge bekannten Daten [Cheong 2007, Hammel 2007, Fitzgerald 2007] ist anzunehmen, dass ABCA3 in der Milchdrüse ebenfalls als Lipidtransporter für bestimmte Phospholipide fungiert. Welches die genauen Substrate von ABCA3 sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Daher erfolgte zur Untersuchung der Rolle von ABCA3 in der Milchdrüse auch eine detaillierte Analyse der Phospholipidzusammensetzung der Milch beider Versuchsgruppen zu den jeweils drei verschiedenen Melkzeitpunkten Tag 5, 10 und 15 der Laktation.

Die Lipidzusammensetzung der Milch aller 13 Wildtyp- und 15 Flox-Weibchen, jeweils für die drei verschiedenen Melktage, wurde, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, analysiert. Angaben in nmol/ml Milch liegen für Cholesterin, die Shingolipide Sphingomyelin und Ceramid, Plasmalogen sowie für folgende Phospholipidklassen vor: Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Lysophosphatidylcholin. Eines der in Bezug auf ABCA3 interessantesten Phospholipide, nämlich Phosphatidylglycerin, konnte wegen technischer Schwierigkeiten nicht analysiert werden, genauso wie Phosphatidylinositol. Es ist derzeit nicht möglich den Gehalt von Phosphatidylglycerin in Milch massenspektrometrisch zu bestimmen. Die Daten wurden wie in 3.3 erläutert ausgewertet.

4.4.1. Cholesterin

Aus Abbildung 4.4.1-1 und Tabelle 13 ist zu entnehmen, dass sich die in der Milch gemessenen Cholesterinwerte zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant verändern, weder an den einzelnen Tagen, noch an allen Tagen zusammengekommen.

Tabelle 13: Cholesterin in nmol/ml Milch

Gruppe		N	Mittelwert	SD	95% CI	p-Wert
Tag 5	WT	13	158,16	70,25	115,71-200,61	n.s.
	Flox	15	164,47	64,61	128,69-200,25	
Tag 10	WT	13	148,49	93,05	92,26-204,72	n.s.
	Flox	15	139,87	42,60	116,28-163,45	
Tag 15	WT	13	115,64	45,45	88,18-143,11	n.s.
	Flox	15	122,15	34,82	102,87-141,43	
Alle Tage	WT	39	140,76	72,70	117,20-164,33	n.s.
	Flox	45	142,16	50,98	126,84-157,48	
Total		84	141,51	61,63	128,14-154,89	

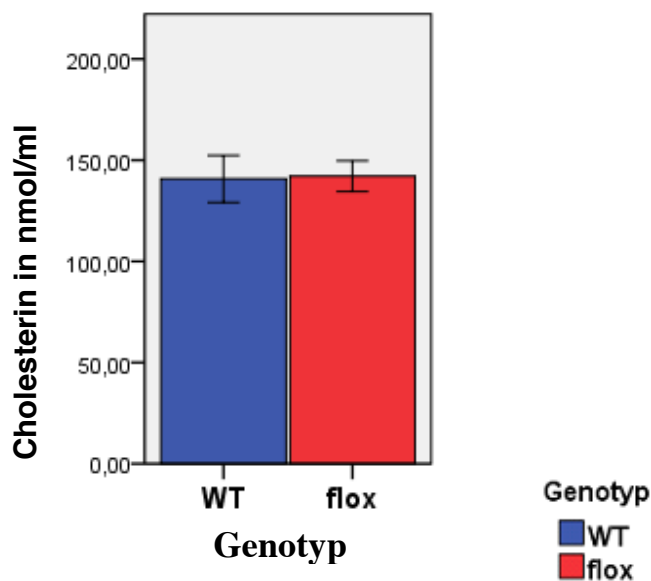


Abbildung 4.4.1-1: Cholesterin in nmol/ml Milch. Blaue Balken: Cholesterinmenge der Milch der Wildtyp-Weibchen, rote Balken: Cholesterinmenge der Milch der *Abca3*-defizienten Weibchen

4.4.2. Phospholipidzusammensetzung der Mausmilch

Wie bereits in Kapitel 4.4 erwähnt, ist es zur Zeit nicht möglich Phosphatidylglycerin in Milch massenspektrometrisch zu analysieren. Auch Phosphatidylinositol konnte aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht analysiert werden.

Abbildung 4.4.2-1 zeigt die absoluten Werte der analysierten Phospholipidklassen in nmol/ml Milch sowie den prozentualen Anteil dieser an der Gesamtheit der analysierten Phospholipide. Phosphatidylcholin lässt sich weiter unterteilen in kurzkettiges (PC 30:0 bis PC 34:0) und langkettiges Phosphatidylcholin. Der Anteil des kurzkettigen PC beträgt 58 % am Gesamtphosphatidylcholin. Die Daten dieser Abbildung beziehen sich ausschließlich auf die Milch der 13 Wildtypmäuse an allen drei Melkterminen (Tag 5, 10 und 15 der Laktation). Die Phospholipidzusammensetzung an den einzelnen Melkterminen unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

In den nächsten beiden Kapiteln wird näher auf die Unterschiede der Milch der *Abca3*-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich der Phospholipide eingegangen.

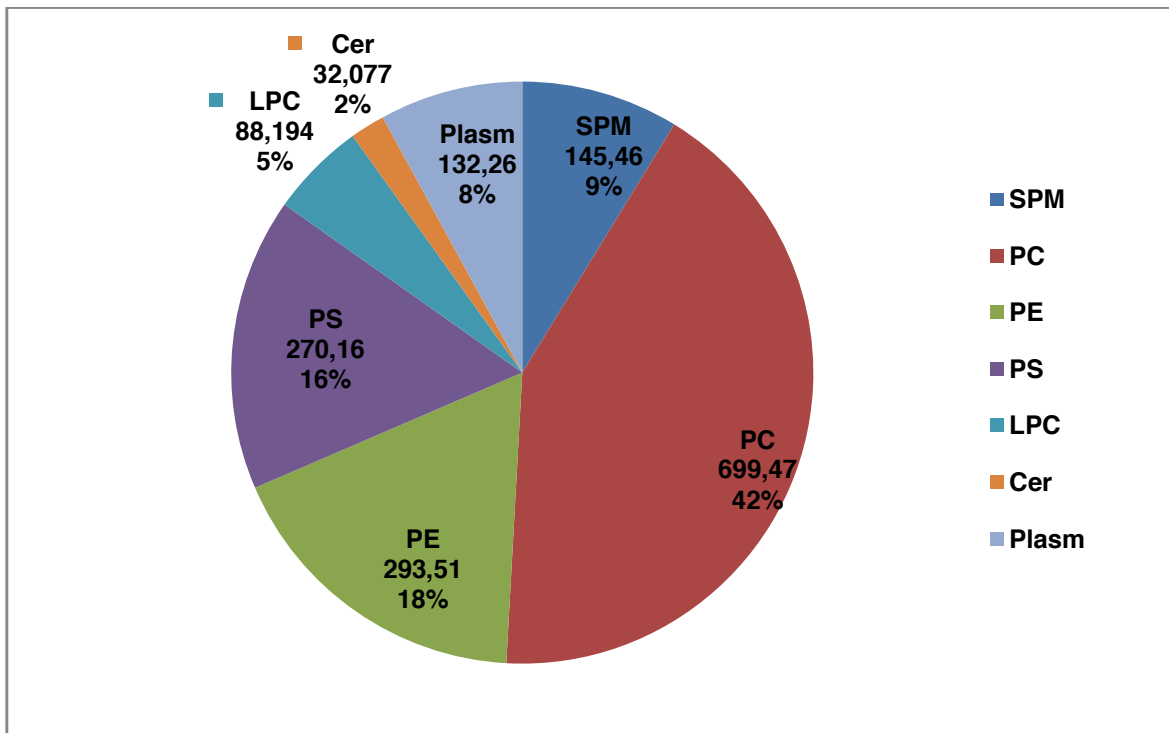


Abbildung 4.4.2-1: Phospholipidzusammensetzung der Wildtyp-Mausmilch. SPM: Sphingomyelin, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, LPC: Lysophosphatidylcholin, Cer: Ceramid, Plasm: Plasmalogen; Die absoluten Werte sind in nmol/ml Milch angegeben.

4.4.2.1. Vergleich der Phospholipide

Die Werte der analysierten Substanzen wurden zum Einen jeweils nur nach Genotyp mit den Daten von allen drei Melkzeitpunkten verglichen. Zum Zweiten wurden alle Werte genotypenspezifisch und getrennt nach Melkzeitpunkt (Tag 5, 10 und 15 der Laktation) ausgewertet.

Es ergab sich für die Milch der geflochten *Abca3*-defizienten Mäuse kein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamt-Phospholipidgehalt im Vergleich zu der Milch der Wildtypen. Die genauen Werte sind in Tabelle 14 dargelegt.

Darüber hinaus zeigte auch der Vergleich der absoluten Werte der verschiedenen Phospholipid-Klassen keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 4.4.2.1-1 sind die Werte graphisch dargestellt. Dabei kann man in den meisten Phospholipid-Klassen geringere Phospholipidwerte erkennen, es ergibt sich allerdings bei relativ hoher Streuung der Werte keine statistische Signifikanz. Dasselbe gilt für den Vergleich dieser Werte getrennt nach den drei verschiedenen Melkzeitpunkten (exakte Werte sind den Tabellen im Anhang unter 7.2 zu entnehmen).

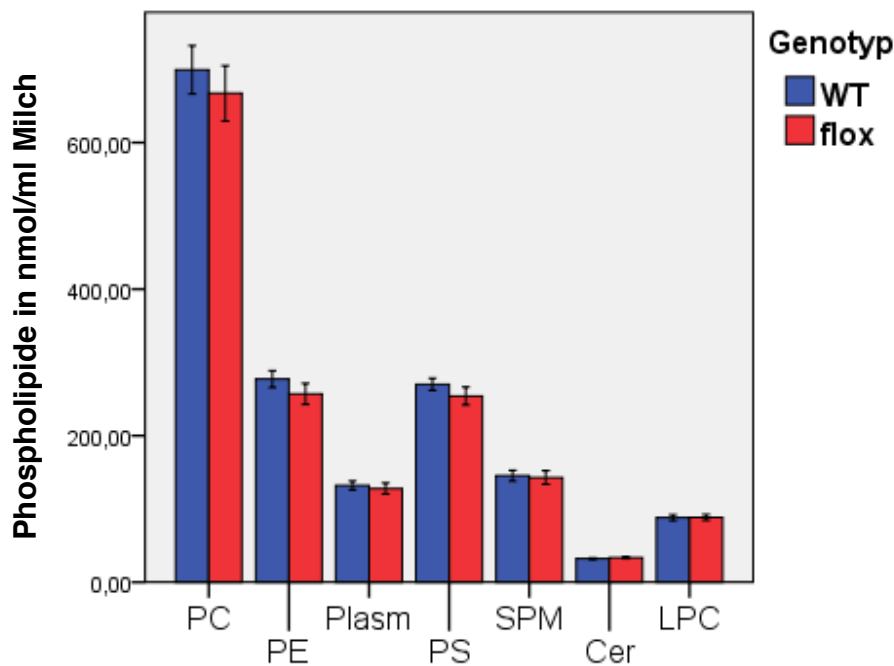


Abbildung 4.4.2.1-1: Phospholipidwerte in nmol/ml Milch der Phospholipidklassen PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, LPC: Lysophosphatidylcholin, Cer: Ceramid, Plasm: Plasmalogen von Wildtyp- (blau) und geflochten Mäusen (rot) im Vergleich

Cholesterin zeigte sich in beiden Versuchsgruppen zu allen Melkzeitpunkten unabhängig vom Genotyp (siehe Kapitel 4.4.1). Daher wurde es als Bezugsgröße zur Normierung der innerhalb der Gruppen stark streuenden Werte gewählt. Dabei wurde jeder einzelne Messwert auf den jeweils korrelierenden Cholesterinwert bezogen und die so zustande gekommenen Daten analysiert.

Tabelle 14: Gesamt-Phospholipidgehalt der Mausmilch in nmol/ml Milch der Wildtypmilch und der Milch der geflochten Weibchen

Tag	Genotyp	n	Mittelwert	SD	95%	CI	p-Wert
Tag 5	WT	13	1636,93	393,75	1398,99	- 1874,88	n.s.
	flox	15	1629,41	818,43	1176,18	- 2082,64	
Tag 10	WT	13	1655,99	526,86	1337,61	- 1974,37	n.s.
	flox	15	1521,67	274,19	1369,83	- 1673,52	
Tag 15	WT	13	1680,39	285,44	1507,90	- 1852,88	n.s.
	flox	15	1600,30	438,26	1357,60	- 1843,00	
Gesamt	Total	84	1618,14	484,81	1512,93	- 1723,35	

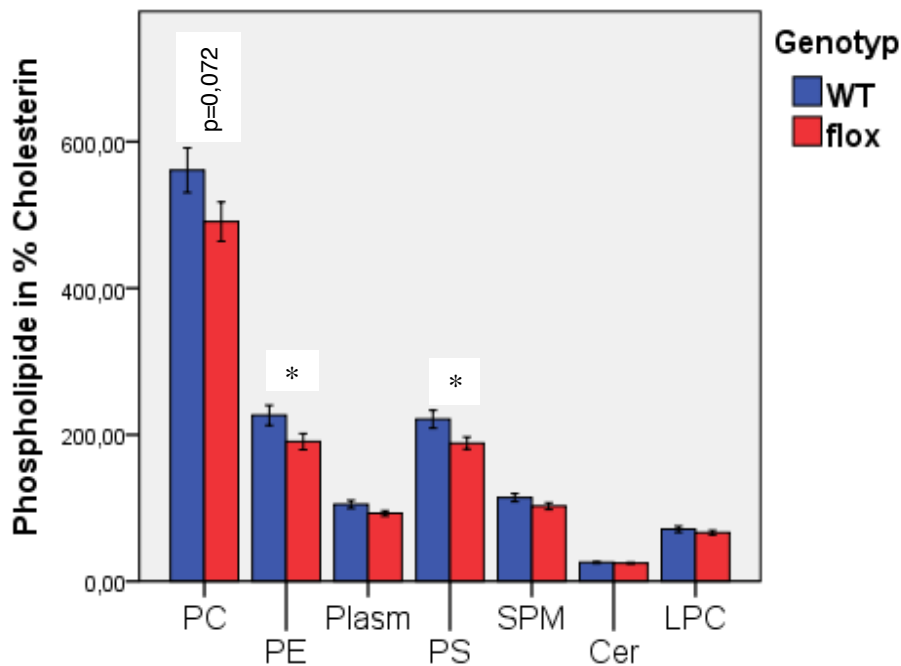


Abbildung 4.4.2.1-2: Darstellung der Phospholipide PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, LPC: Lysophosphatidylcholin, Cer: Ceramid, Plasm: Plasmalogen von Wildtyp- (blau) und geflochten Mäusen (rot) im Vergleich bezogen auf Cholesterin, das selbst keine Unterschiede bezüglich des Genotyps oder des Melkzeitpunktes aufweist (siehe Kapitel 4.4.1). Sterne bedeuten statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Die hinsichtlich der Cholesterinwerte ausgewerteten Daten zeigen einen deutlicheren Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, wie in Abbildung 4.4.2.1-2 gezeigt. Dieser erreichte für PE und PS sogar signifikante p-Werte. Der Unterschied in der PC Konzentration zeigt einen eindeutigen Trend zu weniger PC in der Milch geflochter Weibchen. Dieser Trend war an den jeweils einzelnen Tagen der Laktation für PC, PE und PS nicht zu beobachten. Auch Plasm, SPM, Cer und LPC wiesen keine signifikante Reduktion ihrer Konzentration in der Flox-Gruppe an den einzelnen Tagen auf.

4.4.2.2. Vergleich der Phosphatidylcholin-Subspezies

In gleicher Weise wurden die Daten aller massenspektrometrisch analysierten Phospholipidklassen mit ihren Subspezies statistisch ausgewertet. Dabei ergaben sich in keiner dieser Subspezies in den einzelnen Phospholipidklassen zu keinem der drei Zeitpunkte zusammenhängende signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bis auf eine

Ausnahme: Die Untergruppe der kurzkettigen Phosphatidylcholine. Daher soll im Folgenden auf die einzelnen Phosphatidylcholin-Untergruppen genauer eingegangen werden:

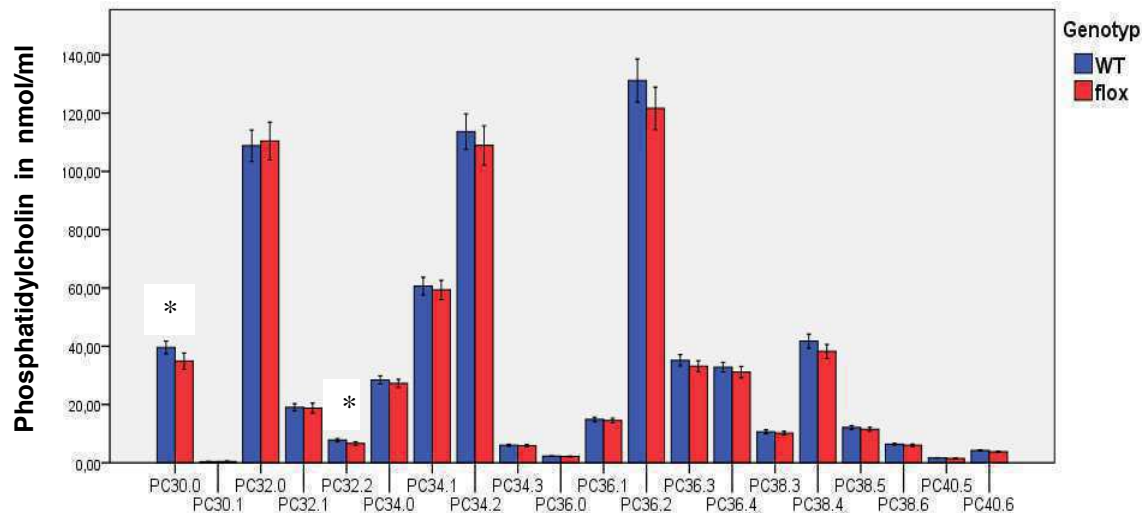


Abbildung 4.4.2.2-1: Graphische Darstellung der einzelnen Subspezies von PC im Vergleich; blau: Wildtyp, rot: Flox-Gruppe; Sterne bedeuten statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Innerhalb der kurzkettigen PC waren die Subspezies PC 30:0 ($p = 0,019$) und PC 32:2 ($p = 0,011$) in der Flox-Gruppe signifikant erniedrigt. Abbildung 4.4.2.2-1 zeigt die einzelnen PC Subspezies im Vergleich der beiden Gruppen. Dabei fällt auf, dass beinahe alle Werte der Flox-Gruppe erniedrigt sind, ausgenommen PC 32:0.

Abbildung 4.4.2.2-2 zeigt nochmals die kurzkettigen PC (rechtes Diagramm) in nmol/ml Milch. Im Vergleich dazu ist daneben die Darstellung derselben PC-Subspezies bezogen auf Cholesterin abgebildet. Dort zeigen auch PC32:0 und PC 32:1 ($p = 0,061$) einen Trend zu niedrigeren Werten in der Flox-Gruppe. PC 30:0 ($p = 0,006$) und PC 32:2 ($p = 0,003$) sind weiterhin signifikant erniedrigt.

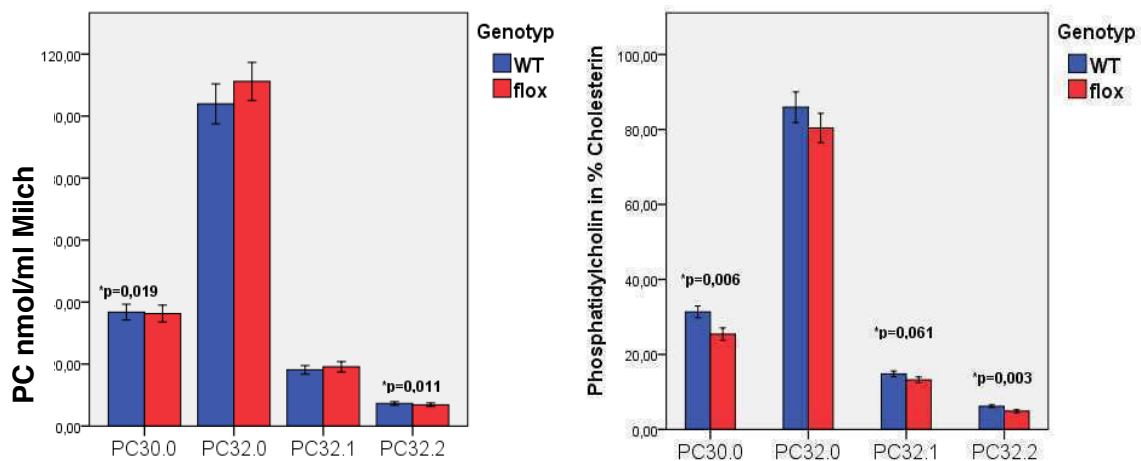


Abbildung 4.4.2.2-2: Darstellung der kurzkettigen PC; rechtes Diagramm: Werte in nmol/ml Milch; linkes Diagramm: Werte bezogen auf Cholesterin; blau: Wildtyp, rot: Flox-Gruppe

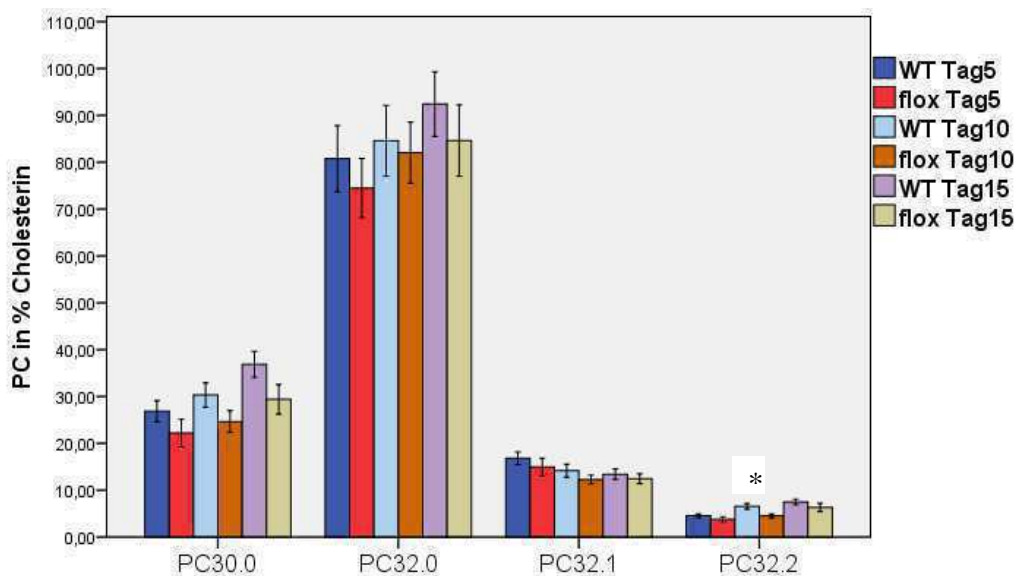


Abbildung 4.4.2.2-3: Diagramm der kurzkettigen PC mit Vergleich Werte der drei verschiedenen Melkzeitpunkte; blau: Wildtyp Tag 5; rot: Flox-Gruppe Tag 5; hellblau: Wildtyp Tag 10; braun: Flox-Gruppe Tag 10; lila: Wildtyp Tag 15; beige: Flox-Gruppe Tag 15; Sterne bedeuten statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

Diese Reduzierung der PC-Konzentration in der Milch der geflochten Weibchen ist immer noch zu sehen, wenn man die Melktermine einzeln auswertet, wie in Abbildung 4.4.2.2-3 dargestellt. Sie erreicht allerdings nur für PC 32:2 an Tag 10 statistische Signifikanz. Dies ist gleichermaßen für die Werte in nmol/ml Milch wie für die auf Cholesterin bezogenen Werte zu beobachten. Im Anhang unter 7.3 sind die einzelnen Werte in Tabellenform aufgelistet.

5. Diskussion

Biologische Membranen, wie zum Beispiel die Zellmembran oder Membranen von Zellorganellen, sind dynamische, sich ständig verändernde Strukturen. Entsprechend des sogenannten „fluid mosaic models“ besitzen sie eine sowohl vertikale als auch laterale Asymmetrie. Die einzelnen Membranbestandteile zeigen eine Häufung in bestimmten Membranabschnitten. So ist PC und SPM vor allem in der äußeren, PS und PE zu einem höheren Anteil in der inneren Schicht der Zellmembran vertreten. Innerhalb einer Schicht finden sich sogenannte „rafts“, Inseln spezieller Phospholipid- und Protein-Ansammlungen, die sich lateral verschieben können. Die abschnittsweise unterschiedliche Membranzusammensetzung bringt auch unterschiedliche Funktionen und Eigenschaften der Membran an den jeweiligen Stellen mit sich. [Dean 2001]

Nicht nur die Lipidzusammensetzung der Membran ist wichtig, auch die Membranproteine sind von Bedeutung. Das Zusammenspiel von Transporter, Substrat, Cosubstraten, Membranzusammensetzung muss für eine adäquate Funktion gewährleistet sein [Klappe et al. 2009]. Flippasen, Translokasen und verschiedene ABC-Transporter vermitteln die Verteilung der Lipidklassen innerhalb der Membran und über diese hinaus [Tannert 2003]. ABCB4 (MDR 3) zum Beispiel ist eine Phosphatidylcholin-Flippase [Kobayashi 2006]. Der ABCG1 vermittelte Efflux von Cholesterin und SPM hängt von dem zellulären SPM Gehalt und der Verteilung von Cholesterin in der Plasmamembran ab [Sano 2007].

In der Milchdrüse sind ABC-Transporter in den Lipidtransport von Cholesterin und Phospholipiden in die MFG involviert [Farke 2008]. Die genauen Mechanismen der Lipidsekretion in die Milch sind noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wurde die Rolle des aus der Lunge bekannten Lipidtransporters ABCA3 für die Milchdrüse und die Lipidzusammensetzung der Milch untersucht. Dabei gelang es, eine konditionale *Abca3* Knockout-Maus bezüglich der Milchdrüse zu generieren, zu mehreren Zeitpunkten der Laktation Milch zu gewinnen und ABCA3 als Transporter für (kurzkettiges) PC auch in der Milchdrüse darzustellen, während andere Substrate hier weniger wahrscheinlich ausschließlich ABCA3 vermittelt transportiert werden. ABCA3 scheint in der Milchdrüse für deren Funktion keine wesentliche Bedeutung im Sinne einer Schlüsselrolle für die Zusammensetzung der Milch zu haben. Dennoch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ABCA3 an der Milchsekretion beteiligt ist. Die einzelnen Aspekte sollen in den folgenden Kapiteln ausführlich erläutert werden.

5.1. Milchgewinnung durch Melken

Das Melken der Mäuse gestaltete sich mit der in Kapitel 3.1.3 und 4.2 genau beschriebenen Vorrichtung weniger zeitaufwendig und stressfreier für Mäuse und Melker bei höherer Milchausbeute im Vergleich zu den Vorversuchen, bei denen noch keine Flüssigkeitsfalle in die Melkvorrichtung eingebaut war.

In der Literatur sind diverse Melkvorrichtungen beschrieben worden. Sie lassen sich grob in manuelle und teilmaschinelle Verfahren unterteilen. Ein rein manuelles Verfahren mittels Pipette, wie in [DePeters 2009; Nakamura, Tomita et al. 2006] beschrieben, war für diese Studie nicht geeignet, da sich nur sehr geringe Milchmengen abmelken lassen. Daher wurde ein System mit Flüssigkeitsfalle entworfen, vergleichbar mit Vorrichtungen aus teilmaschinellen Verfahren [Kokkalis 1986; Oskarsson 2004], das an eine Saugpumpe angeschlossen werden konnte.

Das Melken wurde von den Weibchen gut toleriert und war ohne Narkotika möglich. Der Melkvorgang war so standardisiert wie möglich geplant und durchgeführt worden, so dass Schwankungen in der Milchmenge und Zusammensetzung innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen nicht auf unterschiedliche Rahmenbedingungen beim Melken zurückgeführt werden können (siehe hierzu Kapitel 3.1.3 und 4.2).

5.2. Konditionaler Knockout von *Abca3* im Mammagewebe

Ein konditionales Knockout-Modell für *Abca3* im Mammagewebe war notwendig, da konventionelle homozygote *Abca3*^{-/-} Mäuse ohne Ausnahme direkt nach der Geburt an Lungenversagen sterben [Cheong 2007, Hammel 2007, Fitzgerald 2007, Besnard 2010] und somit eine weitere Analyse eines *Abca3*-Defizites in anderen Organen nicht möglich wäre.

Das Ziel war ein möglichst hoher Knockout-Prozentsatz von *Abca3* im Mammagewebe. In der laktierenden Mamma gelingt der Knockout mittels des *BLG-Cre/LoxP*-Systems zu ca 70 – 80% mit dem höchsten Wert an Tag 10 der Laktation [Selbert 1998]. Von Selbert et al. wurde immunohistochemisch und durch RT-PCR gezeigt, dass sowohl das Cre-Protein als auch die Cre-Aktivität gleichmäßig über die sekretorischen epithelialen Zellen der laktierenden Mamma verteilt sind. Die Hintergrund Rekombination in Nicht-Mammagewebe betrug bei Selbert et al. weniger als 1.1%, unabhängig vom Entwicklungszeitpunkt der Milchdrüse.

Um eine noch höhere Knockout-Rate zu erreichen, wurde nur eines der *Abca3*-Allele mittels *Cre-LoxP*-System ausgeschaltet. Das andere Allel wurde konventionell ausgeknockt. Diese Kombination zweier Modelle ist so nicht immer anwendbar, da schon das Fehlen eines Allels oft zu einem ausgeprägten Phänotyp führt. In diesem Fall ist es aber unproblematisch, da in der Lunge Heterozygotie bezüglich *Abca3* für eine normale Funktion ausreichend ist [Hammel 2007]. Bei einem konditionaler *Abca3*-Knockout in der Lunge, der mittels *Cre-LoxP*-System durchgeführt wurde, überlebten in einer Studie [Besnard 2010] postnatal sogar 30% der Mäuse, allerdings mit teilweise schwerer Beeinträchtigung der Lunge. Dies deutet einerseits auf einen unvollständigen Knockout bei Verwendung dieses Systems hin, andererseits zeigt es, dass auch eine äußerst geringe Restaktivität von ABCA3 für das postnatale Überleben ausreichen kann.

Mit der Kombination aus beiden Systemen (konventioneller und konditionaler Knockout) wurde an Tag 15 der Laktation ein Knockout-Prozentsatz von knapp über 95% erreicht, wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt. Dies bedeutet eine wesentliche Steigerung des ausgeschalteten Genanteils, als es mit dem *Cre-LoxP*-System alleine möglich wäre, und somit einer minimalen ABCA3 Restaktivität.

Dennoch ist eine geringe Restmenge von *Abca3* mRNA in der qRT PCR des Mammagewebes der geflochten Weibchen nachweisbar. Diese ist zwar auch durch die mRNA anderer im Mammagewebe vorhandener Zellen des Binde- und Fettgewebes bedingt. Es muss aber von einer, wenn auch geringen, Leckage des *Cre-LoxP*-Systems und damit vorhandenen Restaktivität von *Abca3* ausgegangen werden, die, wie auch im Lungengewebe, zu einer gerade ausreichenden Funktion des Mammagewebes führen kann.

Problematisch ist hierbei auch, dass das Fehlen von *Abca3* in der Milchdrüsenzelle und in der Milch bei den geflochten Weibchen auf Proteinebene nicht dargestellt werden konnte. Daher ist nicht bekannt, wieviel funktionsfähige *Abca3* Transporter während der Laktation auch bei den geflochten Mäusen noch vorhanden waren, unabhängig von der mRNA Menge. Dies war wegen zu geringer *Abca3* Expression beziehungsweise mangelnder Antikörpersensitivität nicht möglich.

Des Weiteren ist es als problematisch anzusehen, dass die mRNA-Analyse mittels qRT-PCR nur bei insgesamt 12 Weibchen (6 WT versus 6 Flox) erfolgte. Damit ist nicht auszuschließen, dass bei nicht untersuchten geflochten Weibchen im Mammagewebe das *Cre-LoxP*-System nicht funktioniert hat und die Phospholipidwerte der Versuchsgruppe verfälscht sind. Dieser Verdacht wird allerdings weniger wahrscheinlich, wenn man nur die Phospholipid-Werte der 12 Weibchen, deren *Abca3* mRNA analysiert wurde, vergleicht. Es zeigen sich keine höheren Unterschiede zu den Gesamtergebnissen. Die vorher signifikanten Unterschiede verlieren sogar auf Grund der geringeren Fallzahl ihre Signifikanz. Es kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das *Cre-LoxP*-System in allen geflochten Weibchen funktioniert hat.

5.3. Das *Cre-LoxP*-System unter dem oBLG-Promoter

Das Melken weiblicher Säugetiere setzt logischerweise voraus, dass diese in der Lage sind eine normale Milchdrüse auszubilden. Dies war hier erwartungsgemäß der Fall, da bis zur Spätschwangerschaft, auf Grund der erst später einsetzenden Aktivierung des oBLG-Promoters, keine Rekombination im Genom der Brustdrüse stattfinden konnte. Diese beginnt in der Mittschwangerschaft [Clark 1993] und steigt während der Schwangerschaft bis zur Mitte der Laktation um bis zu 30% an [Whitelaw 1992]. Die Frage, ob *Abca3* eine Rolle in der Mammaentwicklung allgemein und während der Differenzierungsvorgänge in der Schwangerschaft im Speziellen spielt, kann damit nicht beantwortet werden.

Wenn ABCA3 in der Milchdrüse eine ähnliche Funktion wie in der Lunge ausführt, so könnte sich dies auch hier auf die Lipidsekretion und damit auf die Laktationsleistung auswirken. Auch diese Fragestellung muss unter dem Aspekt der oben genannten Eigenschaften des oBLG-Promoters gesehen werden. Die konditionalen *Abca3* Knockout-Weibchen waren in der Lage Milch zu geben und ihre Pups ausreichend zu säugen. Durch die während Mittschwangerschaft und beginnender Laktation erst ansteigende Aktivität des Promotors kann in den ersten Tagen der Laktation noch kein maximaler ABCA3 Knockout stattgefunden haben. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass an Tag 5 und Tag 10 der Laktation die Rekombinationsrate der cre-Rekombinase und damit der Knockout von ABCA3 geringer war als an Tag 15. Damit ist auch erklärbar, dass erst an Tag 15 der Laktation ein Unterschied in der Laktationsleistung der Weibchen deutlich wird.

5.4. Milchmenge und Wurfgewicht

Die Laktationskurve der Wildtyp Weibchen dieser Studie entspricht Laktationskurven der Literatur (siehe Kapitel 4.3.1, Abbildung 4.3.1-1). An Tag 5 und Tag 10 der Laktation finden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. An Tag 15 dagegen ist die Milchmenge der geflochten Weibchen signifikant reduziert. Dies deutet darauf hin, dass ABCA3 eine wichtige Rolle für die Sekretion der Milch spielt.

Die Gründe für das späte Auftreten der verminderten Milchsekretion der geflochten Weibchen sind zum Einen systembedingt, wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln erläutert. Die während der Laktation immer noch zunehmende Aktivierung des oBLG-Promoters und die - wenn auch geringfügige- Leckage des *Cre-LoxP*-Systems führen zu einer höheren ABCA3 Funktion an den früheren Tagen der Laktation. Die genaue ABCA3 Expression an Tag 5 und Tag 10 der Laktation konnte in dieser Studie nicht überprüft werden. Es wurde zu diesen Zeitpunkten kein Gewebe entnommen, da alle Weibchen bis Tag 15 gemolken wurden. Zum Anderen ist die Halbwertszeit von *Abca3* nicht bekannt und es ist möglich, dass ein Fehlen von *Abca3* für einige Zeit noch durch verzögerten Abbau der alten Transporter auch bei geringerer Anzahl dieser noch kompensiert werden kann.

Die reduzierte Milchmenge an Tag 15 hatte keine Auswirkungen auf das Gewicht des Wurfes, da die Pups ab Tag 15 – 16 in der Lage sind die Nahrung der Mutter zu fressen und sich somit unabhängig von der Muttermilch ernähren können [Jara-Almonte 1972, Kokkalis 1986].

Die Milchsekretion aus der Milchdrüsenepithelzelle in die Ausführungsgänge findet je nach Substanz auf unterschiedlichen Wegen statt (siehe Kapitel 1.1.2). Von allen Sekretionswegen ist die Lipidsekretion in der Milchdrüse einzigartig und der Sekretionsmechanismus am wenigsten verstanden [McManaman 2003]. ABCA3 als Lipidtransporter ist in der Milchdrüsenzelle in der apikalen Membran und in der Membran der MFG vorhanden [Schimanski 2010]. Die signifikante Reduktion der Milchmenge bei Fehlen von ABCA3 lässt die Vermutung zu, dass ABCA3 wichtig für die Milchsekretion ist. Die

Sekretionsmechanismen von MFG aus der Zelle in die Milch sind noch nicht vollständig geklärt. Es werden im Gegenteil immer mehr Fragen aufgeworfen in Bezug auf die einzelnen Bestandteile der MFG und deren Funktion. So sind wahrscheinlich Butyrophilin–Butyrophilin Interaktionen zwischen dem CLD und der Plasmamembran verantwortlich für das Umschließen des Fetttröpfchen durch die Plasmamembran und die anschließende Abspaltung von der Zelle. Die genauen Mechanismen sind hierfür, sowie für andere Proteine nicht bekannt [Robenek 2009, Ogg 2004]. Auch der genaue Mechanismus, mit dem ABCA3 an der Lipidsekretion und möglicherweise Bildung der MFG beteiligt ist, bleibt weiterhin ungeklärt.

ABCA3 fungiert bekanntlich als Phospholipidtransporter [Cheong 2006; Hammel 2007; Fitzgerald 2007]. Da Phospholipide nur einen geringen Anteil der Milchfette darstellen, aber einen großen Anteil der Membran der Milk Fat Globules (MFGM) ausmachen (siehe Kapitel 1.1.4), ist ABCA3 möglicherweise durch Bereitstellung von Phospholipiden für die Bildung der MFGM an der Milchbildung und –sekretion beteiligt.

5.5. Cholesterin

In der Lipidanalyse der Milch zeigten sich die Cholesterinwerte zwischen den beiden Gruppen an allen Tagen unverändert. Dies entspricht auch den Ergebnissen in den in vivo Studien zu Abca3 in der Lunge [Garmany 2006; Hammel 2007; Fitzgerald 2007]. ABCA3 vermittelter Cholesterintransport wurde zwar in vitro nachgewiesen [Cheong 2006], allerdings in vivo nicht bestätigt worden. Daher ist anzunehmen, dass Cholesterin unabhängig von ABCA3 gebildet und in die Milch sezerniert wird. Deshalb wurde Cholesterin als Bezugswert für die anderen Phospholipide ausgewählt.

5.6. Phospholipide

Studien zu ABCA3 in der Lunge haben gezeigt, dass das Vorhandensein einiger Phospholipidklassen, vor allem Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerin, von der Funktionsfähigkeit von ABCA3 abhängen (siehe Kapitel 1.3). Phosphatidylcholin wird in der Literatur als eines der Substrate von ABCA3 gehandelt. Im Besonderen die kurzkettigen Phosphatidylcholinklassen scheinen von ABCA3 beeinflusst zu sein [Fitzgerald 2007].

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Studien zu ABCA3 im Surfactant der Lunge sind die Unterschiede bezüglich der Phospholipidkonzentrationen in der Milch weniger deutlich ausgeprägt. Für kurzkettiges PC sind aber signifikante Unterschiede vorhanden (siehe Kapitel 4.4.2.2). Damit wurde kurzkettiges PC als Substrat von ABCA3 weiterhin bestätigt. Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin waren in der Versuchsgruppe vermindert. Bezogen auf einen Normwert, in diesem Fall Cholesterin, erreichten diese Werte statistische Signifikanz (siehe Kapitel 4.4.2.1). Über das wichtigste

Substrat von ABCA3 in der Lunge, nämlich Phosphatidylglycerin, ist es hier nicht möglich eine Aussage zu treffen, da sein Gehalt in der Milch derzeit nicht aussagekräftig bestimmt werden kann.

Phospholipide haben eine Schutzfunktion für den Gastrointestinaltrakt der Neugeborenen [Hintze 2011; Dewettinck et al 2008; Carlson 1998]. Cholin spielt außerdem als essentieller Bestandteil der Nahrung eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Gehirns und ist die größte Quelle von Methyl-Gruppen in der Nahrung [Zeisel 2000]. Ein Cholindefizit kann unter anderem zu Leberschäden führen [Buchman 2001]. Ob die Nachkommen der Abca3-defizienten Weibchen durch die geringere Menge an kurzkettigem PC in der Milch diesbezüglich betroffen waren, lies sich in der einfachen Beobachtung nicht erkennen. Es ist jedoch nicht anzunehmen, da mit dem langkettigen PC wohl genügend Cholin in der Milch enthalten ist.

Phospholipide sind wichtig für die Emulsion der unpolaren Fettanteile in der wässrigen Phase der Milch. Sie stabilisieren die MFGM und verhindern eine übermäßige Fusion der Milk Fat Globules, wodurch die spontane Trennung der lipophilen Substanzen von der wässrigen Phase verhindert wird. Trotz der Unterschiede in der Phospholipidzusammensetzung zwischen den beiden Versuchsgruppen war die Milchsekretion an Tag 5 und 10 der Laktation bei den Abca3 defizienten Weibchen nicht beeinträchtigt. An Tag 15 der Laktation kam es zu einer drastischen Reduktion der Milchmenge der Abca3-defizienten Weibchen (siehe Kapitel 4.3.1). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Herabregulation von ABCA3 auch auf molekularer Ebene bestätigt (siehe Kapitel 4.1.3).

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse bezüglich der veränderten Phospholipidzusammensetzung und der Ergebnisse der verminderten Milchmenge an Tag 15 bei nachgewiesener ABCA3 Defizienz bekräftigt die oben genannte Hypothese, dass ABCA3 möglicherweise durch die Bereitstellung bestimmter Phospholipide für die Bildung der Membran der MFGs an der Milchbildung beteiligt ist. Am Höhepunkt der Laktation kann das Phospholipid-Defizit auf grund des ABCA3-Mangels in den MFGs nicht mehr kompensiert werden und die Milchsekretion nimmt signifikant ab. Dabei ändert sich die Gesamtzusammensetzung der Milch nur unbedeutend, da jeweils das gesamte Organell Milchfetttröpfchen mitsamt Inhalt fehlt.

5.7. Genregulation

Die Regulation von ABCA3 erfolgt direkt über das SREBP 1c (Sterol response element binding protein 1 c), das mit dem Promoter von ABCA3 interagiert [Horton 2003]. Abbildung 5.7-1 zeigt das Modell einer Signalkaskade, wie sie in der Lunge abläuft. Bei einem inflammatorischen Prozess erhöhtes IL-6 (Interleukin 6) aktiviert eine Signalkaskade, an deren Ende SREBP 1c steht, das direkt mit dem Promoter von ABCA3 in Kontakt tritt und in der Lage ist dieses hochzuregulieren [Matsuzaki 2008]. In der Brustdrüse wird SREBP1 nach der

Geburt des Wurfes aktiviert und ist für einen ausgeglichenen Triglyceridgehalt in der Milch zuständig. SREBP2 induziert die Cholesterinsynthese. [Rudolph 2007]



Abbildung 5.7-1: Genregulation von ABCA3 in der Lunge. Eine durch Hypoxie ausgelöste IL-6 Ausschüttung im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens führt zu dem folgendem Signalweg, an dessen Ende SREBP1c steht, das wiederum direkt mit dem Promoter von ABCA3 interagiert und ABCA3 hochreguliert. [Matsuzaki 2008]

Es wurde gezeigt, dass eine mammagewebsspezifische Deletion des SREBP cleavage-activating protein (SCAP), ein SREBP Begleitprotein, ohne das SREBP nicht funktionsfähig ist, zu einem signifikanten Laktationsdefizit und einer mehr als dreifachen Herabregulation der Expression mehrerer Gene der Lipidsynthese führt [Rudolph 2010]. Daher ist anzunehmen, dass SREBP auch in der Mamma für die Regulation von ABCA3 von Bedeutung ist.

In der Lunge wird ABCA3 unter Glukokortikoid-Einfluss hochreguliert [Yoshida 2004]. In Zelllinien des Mammakarzinoms wurde herausgefunden, dass ABCA3 Östrogen vermittelt durch ein ERE (estrogen response element) in regulatorischen Abschnitten des *ABCA3*-Gens hochreguliert wird [Lin 2004].

Im Rahmen dieser Studie wurden die mRNA Level von *Srebp1* und *Srebp2* im Mammagewebe von geflochten und Wildtyp-Mäusen untersucht (siehe Kapitel 4.1.4), um eine mögliche veränderte Expression dieser regulatorischen Gene im Zusammenhang mit ABCA3 aufzudecken. Denkbar wäre beispielsweise ein negativer Feedback-Mechanismus, der bei niedrigem Expressionslevel von ABCA3 zu einer Hochregulation von SREBP führt. Diesbezüglich ergab sich jedoch kein Hinweis. *Srebp1* und *Srebp2* wurden in beiden Versuchsgruppen jeweils unverändert exprimiert. Der Verlust von *Abca3* scheint *Srebp1* und 2 in der Mamma nicht zu beeinflussen. Es könnten daher andere Regulationsmechanismen, wie

zum Beispiel der oben genannte Östrogen vermittelte Weg, eher von einem ABCA3-Defizit betroffen sein.

5.8. Weitere ABC-Transporter

Der Effekt des mammaspezifischen ABCA3 Knockouts auf die Phospholipidzusammensetzung fiel in dieser Studie geringer aus als in Untersuchungen von ABCA3 depletiertem Lungengewebe [Hammel 2007]. Daher stellt sich die Frage, ob der Verlust von ABCA3 durch andere Lipidtransporter kompensiert wurde. Die Expression, Lokalisation und Funktion der ABC-Transporter ABCA1, ABCA7 und ABCG1 wurde von Mani et al. im murinen, bovinen und humanem Mammagewebe zu verschiedenen Entwicklungsstadien der Brustdrüse untersucht. Diese Transporter sind in der Mamma in den Cholesterin- und Phospholipidhaushalt involviert [Mani 2010, Mani 2011]. In anderen Geweben, darunter auch besonders der Lunge, sind diese Transportproteine wichtig für die Lipidhomöostase [Baldan 2006, Cavelier 2006]. Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt konnte in dieser Studie keine kompensatorische Hochregulation dieser Transportergene festgestellt werden. Womöglich ist eine normale Funktion dieser Gene ausreichend, um ein ABCA3-Defizit auszugleichen, und es sind weitere, in der Mamma noch weitgehend uncharakterisierte Gene, auch am Lipidtransport beteiligt.

6. Zusammenfassung

ABC-Transporter der Familie A sind weit verbreitete wichtige Membranproteine für den Lipid- und Cholesterinhaushalt der Zelle. Sie schleusen Triacylglycerine, Phospholipide und Cholesterin ATP abhängig über biologische Membranen. ABCA3 ist ein spezifischer Phospholipidtransporter, der hauptsächlich in der Lunge exprimiert wird und dort für die Surfactantfunktion von essentieller Bedeutung ist. Er sitzt in der äußeren Membran der Lamellarkörperchen von Typ II Pneumozyten und transportiert Phosphatidylglycerol und kurzkettige Phosphatidylcholin Spezies als Exporter über diese Membran. Ein ABCA3-Defizit führt beim Menschen und der Maus zu einem akuten Lungenversagen direkt nach der Geburt auf Grund von Surfactant Mangel, unzureichender Lungenentfaltung und Atelektasen.

In der Milchdrüse wird ABCA3 ebenfalls exprimiert. Dort ist es in der Membran von Milk Fat Globules enthalten. Die MFGs enthalten Lipide und Cholesterin und werden zusammen mit der Zellmembran in die Ausführungsgänge der Milchdrüse abgegeben. Sie sorgen durch ihre Membraneigenschaften, die vor allem auf einer differenzierten Phospholipidzusammensetzung beruhen, für die Stabilität der Fett-in-Wasser-Emulsion der Milch. Die Rolle, die ABCA3 hierbei spielt, ist nicht bekannt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ABCA3, analog zu seiner Funktion in der Lunge, in der Milchdrüse ebenfalls für den Phospholipidtransport zuständig ist und eine wichtige Funktion für die Zusammensetzung der Milch und die Lipidsekretion besitzt.

Erste Hinweise hierfür ergaben sich aus einem Pilotprojekt, das eine veränderte Phospholipidzusammensetzung der Milch heterozygoter *Abca3*^{+/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mausmilch zeigte. Daraufhin wurde eine konditionelle *Abca3*-defiziente Maus gezüchtet, die ausschließlich im Mammagewebe kein *Abca3* mehr besitzt. Weibchen dieser Mauslinie wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Laktation im Vergleich zu Wurfgeschwister-Weibchen gemolken und der Wurf phänotypisch beobachtet und gewogen. Die Milch wurde auf den Phospholipidgehalt von sieben Phospholipidspezies und deren Subspezies hin analysiert. Die Expressionslevel von *Abca3* und weiteren assoziierten Genen im laktierenden Mammagewebe (Tag 15 der Laktation) wurden auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht.

Dazu gelang es eine verbesserte Melkvorrichtung mit Flüssigkeitsfalle zu konzipieren und den Melkvorgang zu optimieren. In der anschließenden Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich dem Phänotyp der Mäuse und dem Gewicht des Wurfes, auch wenn das Gewicht der Versuchsgruppe durchschnittlich geringfügig niedriger war.

Es wurde nachgewiesen, dass *Abca3* in dem Mammagewebe der konditionellen Knockout-Mäuse an Tag 15 der Laktation um 95% reduziert war gegenüber den Wildtyp Wurfgeschwistern. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich auch eine signifikante Reduktion der Milchmenge der *Abca3*-defizienten Weibchen bei insgesamt weiterhin erhaltener Fähigkeit zur Laktation und suffizientem Säugen der Nachkommen.

Eine Veränderung weiterer mit ABCA3 in Verbindung stehender Gene konnte nicht festgestellt werden.

Bezüglich des Phospholipidgehalts der Milch ergab sich für einige kurzkettige Phosphatidylcholin Subspezies eine signifikante Reduktion in der Versuchsgruppe. Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin waren vermindert. Der Cholesteringehalt blieb zwischen den Gruppen unverändert.

Diese Ergebnisse bestätigen kurzkettiges Phosphatidylcholin als spezifisches Transportsubstrat von ABCA3 auch in der Milchdrüse.

Die signifikant geringere Milchmenge der Abca3-defizienten Weibchen an Tag 15 der Laktation kann als Hinweis auf eine größere Rolle von ABCA3 für die Milchbildung und -sekretion gesehen werden. Das Vorhandensein von ABCA3 in der Membran der MFGs und die Verminderung der Milchmenge bei dessen Fehlen bestätigt eine Rolle dieses Transporters für die Milchsekretion. Da Phospholipide vor allem in der Membran der MFGs enthalten sind und wesentlich zu deren Stabilität beitragen, ist ABCA3 möglicherweise durch Bereitstellung von Phospholipiden für die Bildung der MFG Membran an der Milchbildung beteiligt. Am Höhepunkt der Laktation kann das Phospholipid-Defizit in den MFGs nicht mehr kompensiert werden und die Milchmenge nimmt durch die verminderte Bildung von MFGs signifikant ab. Dabei ändert sich die Gesamtzusammensetzung der Milch nur unbedeutend, da jeweils das gesamte Organell Milk Fat Globule mitsamt Inhalt fehlt.

7. Anhang

7.1. Melkprotokoll

Käfignr.	J4C5	J4A1	J4A3	J4A2
Ohrstanze	47	1	35	22
Geburtsdatum	30.05.2010	30.05.2010	30.05.2010	31.05.2010
Genotyp	Abcf	WT	Abcf	Abcf
verpaart am [mit Männchen]:	29.07.2010 [m: 12]	28.07.2010 [m: 90]	28.07.2010 [m: 90]	30.07.2010 [m: 13]
Anzahl Pups urspr	7	8	10	3
Geburt am:	17.08.2010	18.08.2010	18.08.2010	19.08.2010
Pups auf 5	18.08.2010	18.08.2010	18.08.2010	19.08.2010
Tag 5	21.08.2010	22.08.2010	22.08.2010	23.08.2010
Milch in μ l	70	110	60	45
Anzahl Zitzen	6	7	7	8
Beschriftung	47.1	1.1	35.1	22.1
Tag 10	26.08.2010	27.08.2010	27.08.2010	28.08.2010
Milch in μ l	200	120	170	200
Beschriftung	47.2	1.2	35.2	22.2
Tag 15	31.08.2010	01.09.2010	01.09.2010	02.09.2010
Milch in μ l	170	100	90	70
Beschriftung	47.3	1.3	35.3	22.3
Wurfgewicht Tag 2	8 g	10 g	6 g	5 g
Tag 5	16 g	17 g	13 g	9 g
Tag 10	21 g	30 g	24 g	22 g
Tag 15 gesamt	29 g	40 g	29 g	25 g
Tag 15 Pup 1	6	8	6	4
Tag 15 Pup 2	6	8	7	5
Tag 15 Pup 3	6	8	7	6
Tag 15 Pup 4	5	7	5	5
Tag 15 Pup 5	6	9	4	5

Käfignr.	J4A4	J4E1	J4C2	J4C4
Ohrstanze	12	7	25	15
Geburtsdatum	30.05.2010	31.05.2010	31.05.2010	30.05.2010
Genotyp	Abcf	Abcf	Abcf	Abcf
verpaart am [mit Männchen]:	29.07.2010 [m: 12]	29.07.2010 [m: 64]	30.07.2010 [m: 13]	29.07.2010 [m: 12]
Anzahl Pups urspr	5	8	10	5
Geburt am:	19.08.2010	19.08.2010	21.08.2010	21.08.2010
Pups auf 5	19.08.2010	19.08.2010	21.08.2010	21.08.2010
Tag 5	23.08.2010	23.08.2010	25.08.2010	25.08.2010
Milch in μ l	100	125	50	5
Anzahl Zitzen	8	8	7	6
Beschriftung	12.1	7.1	25.1	15.1
Tag 10	28.08.2010	28.08.2010	30.08.2010	30.08.2010
Milch in μ l	230	150	230	30
Beschriftung	12.2	7.2	25.2	15.2

Tag 15	02.09.2010	02.09.2010	04.09.2010	04.09.2010
Milch in μ l	140	30	70	50
Beschriftung	12.3	7.3	25.3	15.3
Wurfgewicht Tag 2	7 g	7 g	8 g	9 g
Tag 5	14 g	14 g	13 g	12 g
Tag 10	28 g	25 g	29 g	29 g
Tag 15 gesamt	35 g	33 g	39 g	30 g
Tag 15 Pup 1	7	6	8	6
Tag 15 Pup 2	7	6	8	6
Tag 15 Pup 3	7	7	8	6
Tag 15 Pup 4	7	7	7	6
Tag 15 Pup 5	7	7	8	6

Käfignr.	J4E2	J4A5	J4D1	J4D6
Ohrstanze	9	17	20	67
Geburtsdatum	30.05.2010	31.05.2010	31.05.2010	04.06.2010
Genotyp	WT	Abcf	WT	WT
verpaart am [mit Männchen]:	29.07.2010 [m: 64]	30.07.2010 [m: 58]	30.07.2010 [m: 58]	03.08.2010 [m: 62]
Anzahl Pups urspr	10	5	10	8
Geburt am:	21.08.2010	22.08.2010	22.08.2010	22.08.2010
Pups auf 5	21.08.2010	22.08.2010	22.08.2010	22.08.2010
Tag 5	25.08.2010	26.08.2010	26.08.2010	26.08.2010
Milch in μ l	60	175	50	165
Anzahl Zitzen	6	6	4	6
Beschriftung	9.1	17.1	20.1	67.1
Tag 10	30.08.2010	31.08.2010	31.08.2010	31.08.2010
Milch in μ l	80	70	85	115
Beschriftung	9.2	17.2	20.2	67.2
Tag 15	04.09.2010	05.09.2010	05.09.2010	05.09.2010
Milch in μ l	100	60	70	45
Beschriftung	9.3	17.3	20.3	67.3
Wurfgewicht Tag 2	7 g	7 g	7 g	6 g
Tag 5	12 g	13 g	15 g	15 g
Tag 10	32 g	26 g	22 g	29 g
Tag 15 gesamt	40 g	34 g	32 g	38 g
Tag 15 Pup 1	8	7	7	7
Tag 15 Pup 2	8	6	6	8
Tag 15 Pup 3	8	7	6	8
Tag 15 Pup 4	8	7	6	7
Tag 15 Pup 5	8	7	7	8

Käfignr.	J4B1	J4C1	J4B4	J4B2
Ohrstanze	74	36	6	64
Geburtsdatum	06.06.2010	30.05.2010	31.05.2010	04.06.2010
Genotyp	WT	Abcf	Abcf	Abcf
verpaart am [mit Männchen]:	03.08.2010 [m: 63]	28.07.2010 [m: 90]	29.07.2010 [m: 64]	03.08.2010 [m: 62]
Anzahl Pups urspr	10	6	8	10
Geburt am:	23.08.2010	23.08.2010	24.08.2010	26.08.2010
Pups auf 5	23.08.2010	23.08.2010	24.08.2010	26.08.2010
Tag 5	27.08.2010	27.08.2010	28.08.2010	30.08.2010
Milch in μ l	245	130	195	30
Anzahl Zitzen	7	7	7	7
Beschriftung	74.1	36.1	6.1	64.1
Tag 10	01.09.2010	01.09.2010	02.09.2010	04.09.2010
Milch in μ l	210	130	210	35
Beschriftung	74.2	36.2	6.2	64.2
Tag 15	06.09.2010	06.09.2010	07.09.2010	09.09.2010
Milch in μ l	150	45	320	60
Beschriftung	74.3	36.3	6.3	64.3
Wurfgewicht Tag 2	6 g	7 g	6 g	6 g
Tag 5	13 g	14 g	14 g	15 g
Tag 10	28 g	26 g	30 g	30 g
Tag 15 gesamt	34 g	35 g	39 g	35 g
Tag 15 Pup 1	7	6	8	7
Tag 15 Pup 2	7	8	8	7
Tag 15 Pup 3	7	7	8	7
Tag 15 Pup 4	7	7	8	7
Tag 15 Pup 5	6	7	7	7

Käfignr.	J4C3	J4D5	J4D4	J4C6
Ohrstanze	58	65	76	18
Geburtsdatum	31.05.2010	04.06.2010	06.06.2010	31.05.2010
Genotyp	WT	Abcf	Abcf	WT
verpaart am [mit Männchen]:	30.07.2010 [m: 13]	03.08.2010 [m: 62]	03.08.2010 [m: 63]	30.07.2010 [m: 58]
Anzahl Pups urspr	9	9	9	9
Geburt am:	27.08.2010	28.08.2010	29.08.2010	01.09.2010
Pups auf 5	27.08.2010	28.08.2010	29.08.2010	02.09.2010
Tag 5	31.08.2010	01.09.2010	02.09.2010	05.09.2010
Milch in μ l	40	100	50	15
Anzahl Zitzen	7	6	6	6
Beschriftung	58.1	65.1	76.1	18.1
Tag 10	05.09.2010	06.09.2010	07.09.2010	10.09.2010
Milch in μ l	105	140	120	210
Beschriftung	58.2	65.2	76.2	18.2
Tag 15	10.09.2010	11.09.2010	12.09.2010	15.09.2010
Milch in μ l	230	80	50	200
Beschriftung	58.3	65.3	76.3	18.3
Wurfgewicht Tag 2	7 g	7 g	7 g	8 g
Tag 5	17 g	16 g	14 g	14 g
Tag 10	32 g	32 g	25 g	28 g

Tag 15 gesamt	42 g	41 g	34 g	35 g
Tag 15 Pup 1	8	8	6	7
Tag 15 Pup 2	8	8	7	7
Tag 15 Pup 3	8	8	7	7
Tag 15 Pup 4	9	8	7	7
Tag 15 Pup 5	9	9	7	7

Käfignr.	J4E4	K2E2	J4A1	J4A3
Ohrstanze	2	21	4	40
Geburtsdatum	23.06.2010	23.06.2010	23.06.2010	14.06.2010
Genotyp	WT	WT	WT	WT
verpaart am [mit Männchen]:	20.08.2010 [m: 64]	20.08.2010 [m: 90]	20.08.2010 [m: 64]	20.08.2010 [m: 64]
Anzahl Pups urspr	8	5	10	8
Geburt am:	09.09.2010	09.09.2010	10.09.2010	10.09.2010
Pups auf 5	09.09.2010	09.09.2010	10.09.2010	10.09.2010
Tag 5	13.09.2010	13.09.2010	14.09.2010	14.09.2010
Milch in μ l	110	140	35	160
Anzahl Zitzen	7	7	7	8
Beschriftung	2.1	21.1	4.1	40.1
Tag 10	18.09.2010	18.09.2010	19.09.2010	19.09.2010
Milch in μ l	130	230	80	180
Beschriftung	2.2	21.2	4.2	40.2
Tag 15	23.09.2010	23.09.2010	24.09.2010	24.09.2010
Milch in μ l	190	260	240	520
Beschriftung	2.3	21.3	4.3	40.3
Wurfgewicht Tag 2	6 g	9 g	7 g	8 g
Tag 5	12 g	17 g	14 g	16 g
Tag 10	25 g	29 g	29 g	28 g
Tag 15 gesamt	34 g	37 g	38 g	38 g
Tag 15 Pup 1	7	8	8	8
Tag 15 Pup 2	7	8	8	8
Tag 15 Pup 3	7	8	8	8
Tag 15 Pup 4	7	7	7	7
Tag 15 Pup 5	6	6	7	7

Käfignr.	J4B3	J4B5	J4E3	J4E5
Ohrstanze	24	51	50	27
Geburtsdatum	26.06.2010	01.07.2010	01.07.2010	23.06.2010
Genotyp	Abcf	WT	WT	Abcf
verpaart am [mit Männchen]:	20.08.2010 [m: 90]	28.08.2010 [m: 58]	28.08.2010 [m: 63]	28.08.2010 [m: 62]
Anzahl Pups urspr	8	6	8	9
Geburt am:	12.09.2010	17.09.2010	19.09.2010	21.09.2010
Pups auf 5	12.09.2010	18.09.2010	19.09.2010	21.09.2010
Tag 5	16.09.2010	21.09.2010	23.09.2010	25.09.2010
Milch in μ l	205	110	110	30
Anzahl Zitzen	7	8	7	7
Beschriftung	24.1	51.1	50.1	27.1
Tag 10	21.09.2010	26.09.2010	28.09.2010	30.09.2010
Milch in μ l	220	60	290	140

Beschriftung	24.2	51.2	50.2	27.2
Tag 15	26.09.2010	01.10.2010	03.10.2010	05.10.2010
Milch in μ l	180	460	200	80
Beschriftung	24.3	51.3	50.3	27.3
Wurfgewicht Tag 2	9 g	6 g	9 g	9 g
Tag 5	17 g	14 g	16 g	18 g
Tag 10	32 g	23 g	30 g	29 g
Tag 15 gesamt	42 g	33 g	37 g	40 g
Tag 15 Pup 1	8	6	7	8
Tag 15 Pup 2	8	6	7	8
Tag 15 Pup 3	8	7	7	8
Tag 15 Pup 4	9	7	8	8
Tag 15 Pup 5	9	7	8	8

7.2. Datentabelle der Gesamt-Phospholipidauswertung

Phospholipid	Gruppe	Genotyp	n	Mittelwert	SD			p-Wert
PC absolut	Tag 5	WT	13	653,17	182,91	542,64	- 763,70	n.s.
		flox	15	650,64	355,55	453,74	- 847,54	
	Tag 10	WT	13	726,26	273,04	561,26	- 891,26	n.s.
		flox	15	659,31	150,82	575,79	- 742,83	
	Tag 15	WT	13	718,98	151,28	627,56	- 810,39	n.s.
		flox	15	691,65	229,28	564,68	- 818,62	
	Gesamt	Total	84	682,18	232,14	631,80	- 732,56	
SPM absolut	Tag 5	WT	13	158,11	39,83	134,04	- 182,18	n.s.
		flox	15	165,05	94,28	112,84	- 217,26	
	Tag 10	WT	13	143,42	59,68	107,36	- 179,49	n.s.
		flox	15	135,98	30,94	118,84	- 153,12	
	Tag 15	WT	13	134,84	31,43	115,85	- 153,83	n.s.
		flox	15	127,83	38,60	106,45	- 149,20	
	Gesamt	Total	84	144,11	54,61	132,26	- 155,97	
PE absolut	Tag 5	WT	13	245,83	63,56	207,42	- 284,24	n.s.
		flox	15	239,97	130,76	167,56	- 312,39	
	Tag 10	WT	13	279,75	87,11	227,11	- 332,39	n.s.
		flox	15	243,29	50,53	215,31	- 271,27	
	Tag 15	WT	13	306,21	52,22	274,65	- 337,76	n.s.
		flox	15	287,89	88,35	238,97	- 336,82	
	Gesamt	Total	84	266,44	85,76	247,82	- 285,05	
Plasm absolut	Tag 5	WT	13	164,54	34,07	143,95	- 185,13	n.s.
		flox	15	161,59	71,77	121,85	- 201,34	
	Tag 10	WT	13	121,30	32,95	101,39	- 141,21	n.s.
		flox	15	112,26	18,41	102,07	- 122,45	
	Tag 15	WT	13	110,94	21,45	97,97	- 123,90	n.s.
		flox	15	109,87	22,86	97,21	- 122,53	

	Gesamt	Total	84	129,93	44,40	120,29	-	139,56	
PS absolut	Tag 5	WT	13	277,11	56,41	243,02	-	311,20	
		flox	15	270,47	125,73	200,84	-	340,09	n.s.
	Tag 10	WT	13	259,29	57,34	224,64	-	293,94	
		flox	15	237,20	28,24	221,56	-	252,84	n.s.
	Tag 15	WT	13	274,10	39,05	250,50	-	297,70	
		flox	15	254,75	60,01	221,52	-	287,99	n.s.
	Gesamt	Total	84	261,58	68,97	246,61	-	276,55	
LPC absolut	Tag 5	WT	13	91,63	27,62	74,94	-	108,33	
		flox	15	94,93	35,67	75,18	-	114,69	n.s.
	Tag 10	WT	13	82,97	28,25	65,90	-	100,04	
		flox	15	88,15	16,37	79,08	-	97,22	n.s.
	Tag 15	WT	13	89,97	20,88	77,35	-	102,59	
		flox	15	82,84	25,22	68,88	-	96,81	n.s.
	Gesamt	Total	84	88,43	26,00	82,79	-	94,07	
Cer absolut	Tag 5	WT	13	32,36	7,25	27,98	-	36,75	
		flox	15	33,40	11,95	26,78	-	40,02	n.s.
	Tag 10	WT	13	30,75	8,91	25,37	-	36,13	
		flox	15	33,22	5,71	30,06	-	36,39	n.s.
	Tag 15	WT	13	33,12	6,57	29,15	-	37,09	
		flox	15	33,96	8,59	29,20	-	38,72	n.s.
	Gesamt	Total	84	32,85	8,27	31,06	-	34,65	
PC % Cholesterin	Tag 5	WT	13	440,16	118,82	368,35	-	511,96	
		flox	15	393,24	135,67	318,10	-	468,37	n.s.
	Tag 10	WT	13	568,29	184,54	456,77	-	679,81	
		flox	15	492,59	129,73	420,75	-	564,43	n.s.
	Tag 15	WT	13	674,51	189,41	560,05	-	788,97	
		flox	15	587,04	214,96	468,00	-	706,08	n.s.
	Gesamt	Total	84	523,47	186,63	482,97	-	563,97	0,07
SPM % Cholesterin	Tag 5	WT	13	106,60	27,46	90,01	-	123,19	
		flox	15	101,35	43,11	77,47	-	125,22	n.s.
	Tag 10	WT	13	110,28	38,46	87,04	-	133,53	
		flox	15	100,75	21,86	88,64	-	112,85	n.s.
	Tag 15	WT	13	125,65	35,34	104,29	-	147,00	
		flox	15	105,83	23,53	92,80	-	118,86	n.s.
	Gesamt	Total	84	108,00	32,54	100,93	-	115,06	
PE % Cholesterin	Tag 5	WT	13	166,34	41,86	141,04	-	191,63	
		flox	15	146,12	51,69	117,49	-	174,74	n.s.
	Tag 10	WT	13	223,06	76,92	176,58	-	269,54	
		flox	15	182,01	46,61	156,20	-	207,83	n.s.
	Tag 15	WT	13	290,13	87,75	237,11	-	343,16	
		flox	15	244,07	83,22	197,98	-	290,15	n.s.
	Gesamt	Total	84	207,34	81,36	189,69	-	225,00	0,05
Plasm % Cholesterin	Tag 5	WT	13	112,88	31,28	93,98	-	131,79	
		flox	15	101,62	31,79	84,02	-	119,22	n.s.
	Tag 10	WT	13	98,08	39,19	74,40	-	121,76	
		flox	15	83,62	17,09	74,15	-	93,08	n.s.

	Tag 15	WT	13	104,41	31,50	85,38	-	123,44	n.s.
		flox	15	92,94	19,98	81,88	-	104,00	
	Gesamt	Total	84	98,48	29,65	92,05	-	104,92	
PS % Cholesterin	Tag 5	WT	13	190,21	51,98	158,80	-	221,62	n.s.
		flox	15	169,78	57,31	138,04	-	201,52	
	Tag 10	WT	13	212,35	79,80	164,13	-	260,57	n.s.
		flox	15	179,11	40,32	156,78	-	201,43	
	Tag 15	WT	13	261,15	80,25	212,66	-	309,64	n.s.
		flox	15	216,46	58,86	183,86	-	249,05	
	Gesamt	Total	84	203,67	67,52	189,02	-	218,32	0,05
LPC % Cholesterin	Tag 5	WT	13	63,37	24,71	48,44	-	78,30	n.s.
		flox	15	61,16	19,55	50,33	-	71,99	
	Tag 10	WT	13	65,39	27,48	48,78	-	82,00	n.s.
		flox	15	67,48	21,10	55,79	-	79,16	
	Tag 15	WT	13	84,61	24,49	69,81	-	99,41	n.s.
		flox	15	70,39	21,31	58,59	-	82,20	
	Gesamt	Total	84	68,56	23,61	63,44	-	73,69	
Cer % Cholesterin	Tag 5	WT	13	22,05	6,03	18,40	-	25,69	n.s.
		flox	15	21,04	5,50	17,99	-	24,09	
	Tag 10	WT	13	24,25	7,67	19,61	-	28,88	n.s.
		flox	15	24,89	5,85	21,65	-	28,13	
	Tag 15	WT	13	30,64	6,94	26,45	-	34,83	n.s.
		flox	15	28,42	5,92	25,14	-	31,70	
	Gesamt	Total	84	25,18	6,99	23,67	-	26,70	
alle PL	Tag 5	WT	13	1636,93	393,75	1398,99	-	1874,88	n.s.
		flox	15	1629,41	818,43	1176,18	-	2082,64	
	Tag 10	WT	13	1655,99	526,86	1337,61	-	1974,37	n.s.
		flox	15	1521,67	274,19	1369,83	-	1673,52	
	Tag 15	WT	13	1680,39	285,44	1507,90	-	1852,88	n.s.
		flox	15	1600,30	438,26	1357,60	-	1843,00	
	Gesamt	Total	84	1618,14	484,81	1512,93	-	1723,35	

7.3. Datentabellen der Phosphatidycholinauswertung

Tabelle 15: Phosphatidylcholin-Subspezies in nmol/ml Milch

Phospholipid	Gruppe	Genotyp	n	Mittelwert	SD	95%	CI	p-Wert
PC30.1	Tag 5	WT	13	0,51	0,88	-0,02	-	1,04
		flox	15	0,68	1,75	-0,29	-	1,65
	Tag 10	WT	13	0,37	0,94	-0,19	-	0,94
		flox	15	0,22	0,43	-0,02	-	0,46
	Tag 15	WT	13	0,26	0,43	0,00	-	0,52
		flox	15	0,45	0,58	0,13	-	0,77
	Gesamt	Total	84	0,42	0,95	0,21	-	0,62
								n.s.

PC30.0	Tag 5	WT	13	39,14	9,40	33,46	-	44,83	n.s.
		flox	15	37,29	27,24	22,20	-	52,38	
	Tag 10	WT	13	39,83	20,01	27,74	-	51,93	n.s.
		flox	15	32,97	11,79	26,44	-	39,50	
	Tag 15	WT	13	39,78	10,50	33,44	-	46,12	n.s.
		flox	15	34,44	14,07	26,65	-	42,24	
	Gesamt	Total	84	37,07	16,61	33,47	-	40,68	0,019
PC32.2	Tag 5	WT	13	6,67	1,95	5,49	-	7,85	n.s.
		flox	15	6,48	5,26	3,57	-	9,40	
	Tag 10	WT	13	8,59	4,41	5,93	-	11,25	0,046
		flox	15	6,06	2,35	4,75	-	7,36	
	Tag 15	WT	13	8,11	2,51	6,60	-	9,63	n.s.
		flox	15	7,35	3,89	5,19	-	9,50	
	Gesamt	Total	84	7,17	3,64	6,38	-	7,96	0,011
PC32.1	Tag 5	WT	13	24,59	5,93	21,01	-	28,17	n.s.
		flox	15	25,16	17,38	15,54	-	34,79	
	Tag 10	WT	13	18,26	9,09	12,77	-	23,76	n.s.
		flox	15	16,39	4,49	13,91	-	18,88	
	Tag 15	WT	13	14,26	3,18	12,34	-	16,18	n.s.
		flox	15	14,73	4,94	11,99	-	17,46	
	Gesamt	Total	84	18,89	9,84	16,76	-	21,03	n.s.
PC32.0	Tag 5	WT	13	119,37	35,00	98,22	-	140,52	n.s.
		flox	15	121,03	60,19	87,70	-	154,36	
	Tag 10	WT	13	108,06	40,82	83,39	-	132,73	n.s.
		flox	15	110,52	33,09	92,19	-	128,84	
	Tag 15	WT	13	99,08	22,26	85,63	-	112,53	n.s.
		flox	15	99,79	32,17	81,98	-	117,61	
	Gesamt	Total	84	109,70	39,16	101,20	-	118,20	n.s.
PC34.3	Tag 5	WT	13	6,57	2,06	5,32	-	7,81	n.s.
		flox	15	6,78	4,12	4,49	-	9,06	
	Tag 10	WT	13	6,16	2,79	4,48	-	7,85	n.s.
		flox	15	5,38	1,51	4,54	-	6,22	
	Tag 15	WT	13	5,25	1,35	4,43	-	6,06	n.s.
		flox	15	5,43	2,08	4,28	-	6,58	
	Gesamt	Total	84	5,92	2,52	5,38	-	6,47	n.s.
PC34.2	Tag 5	WT	13	112,14	33,84	91,69	-	132,58	n.s.
		flox	15	112,71	62,51	78,09	-	147,32	
	Tag 10	WT	13	119,61	51,02	88,79	-	150,44	n.s.
		flox	15	106,56	29,88	90,01	-	123,11	
	Tag 15	WT	13	109,25	27,87	92,41	-	126,09	n.s.
		flox	15	107,53	39,52	85,65	-	129,41	
	Gesamt	Total	84	111,13	41,78	102,06	-	120,20	n.s.
PC34.1	Tag 5	WT	13	62,32	17,09	51,99	-	72,64	n.s.
		flox	15	61,80	33,75	43,11	-	80,48	
	Tag 10	WT	13	63,42	24,86	48,40	-	78,44	n.s.
		flox	15	59,09	12,67	52,08	-	66,11	
	Tag 15	WT	13	56,17	13,96	47,73	-	64,60	

PC34.0		flox	15	57,16	16,22	48,17	-	66,14	n.s.
	Gesamt	Total	84	59,95	20,75	55,44	-	64,45	n.s.
	Tag 5	WT	13	21,07	6,81	16,96	-	25,18	n.s.
		flox	15	20,78	9,14	15,72	-	25,85	
	Tag 10	WT	13	31,31	8,79	26,00	-	36,62	n.s.
		flox	15	30,00	5,97	26,69	-	33,30	
	Tag 15	WT	13	32,82	6,27	29,03	-	36,61	n.s.
		flox	15	30,99	9,52	25,72	-	36,26	
	Gesamt	Total	84	27,79	9,14	25,80	-	29,77	n.s.
PC36.5	Tag 5	WT	13	3,04	1,07	2,39	-	3,69	n.s.
		flox	15	3,24	2,03	2,11	-	4,36	
	Tag 10	WT	13	3,20	1,20	2,48	-	3,93	n.s.
		flox	15	2,85	0,86	2,38	-	3,33	
	Tag 15	WT	13	2,77	0,68	2,36	-	3,18	n.s.
		flox	15	2,96	1,17	2,32	-	3,61	
	Gesamt	Total	84	3,01	1,23	2,74	-	3,28	n.s.
	Tag 5	WT	13	31,54	9,79	25,63	-	37,46	n.s.
		flox	15	31,22	18,18	21,15	-	41,28	
PC36.4	Tag 10	WT	13	34,03	13,18	26,07	-	42,00	n.s.
		flox	15	30,36	7,94	25,96	-	34,76	
	Tag 15	WT	13	32,75	8,00	27,92	-	37,59	n.s.
		flox	15	31,76	11,96	25,14	-	38,38	
	Gesamt	Total	84	31,89	11,84	29,32	-	34,45	n.s.
PC36.3	Tag 5	WT	13	32,59	9,84	26,64	-	38,54	n.s.
		flox	15	31,87	16,69	22,62	-	41,11	
	Tag 10	WT	13	37,68	15,71	28,18	-	47,17	n.s.
		flox	15	33,49	8,69	28,68	-	38,30	
	Tag 15	WT	13	35,23	9,80	29,31	-	41,15	n.s.
		flox	15	33,97	12,40	27,10	-	40,83	
	Gesamt	Total	84	34,06	12,36	31,38	-	36,75	n.s.
PC36.2	Tag 5	WT	13	99,23	32,92	79,33	-	119,12	n.s.
		flox	15	98,16	52,75	68,95	-	127,38	
	Tag 10	WT	13	137,78	51,15	106,88	-	168,69	n.s.
		flox	15	120,21	26,29	105,66	-	134,77	
	Tag 15	WT	13	156,58	35,25	135,27	-	177,88	n.s.
		flox	15	146,60	53,53	116,96	-	176,24	
	Gesamt	Total	84	126,09	47,82	115,71	-	136,46	n.s.
PC36.1	Tag 5	WT	13	12,26	3,96	9,86	-	14,65	n.s.
		flox	15	12,34	6,51	8,74	-	15,94	
	Tag 10	WT	13	16,09	6,12	12,39	-	19,79	n.s.
		flox	15	14,63	3,43	12,73	-	16,53	
	Tag 15	WT	13	16,22	3,64	14,02	-	18,42	n.s.
		flox	15	16,53	5,24	13,63	-	19,43	
	Gesamt	Total	84	14,67	5,15	13,55	-	15,78	n.s.
PC36.0	Tag 5	WT	13	1,98	0,59	1,63	-	2,33	n.s.
		flox	15	1,99	1,04	1,41	-	2,57	
	Tag 10	WT	13	2,13	0,69	1,71	-	2,54	

		flox	15	2,03	0,47	1,77	-	2,29	n.s.
	Tag 15	WT	13	2,67	0,61	2,30	-	3,04	
		flox	15	2,46	0,88	1,97	-	2,95	n.s.
	Gesamt	Total	84	2,20	0,77	2,04	-	2,37	n.s.
PC38.6	Tag 5	WT	13	6,67	1,66	5,67	-	7,67	
		flox	15	6,70	3,74	4,62	-	8,77	n.s.
	Tag 10	WT	13	6,64	2,30	5,25	-	8,03	
		flox	15	5,71	1,74	4,74	-	6,68	n.s.
	Tag 15	WT	13	5,71	1,40	4,87	-	6,56	
		flox	15	5,63	2,17	4,44	-	6,83	n.s.
	Gesamt	Total	84	6,17	2,31	5,66	-	6,67	n.s.
PC38.5	Tag 5	WT	13	10,74	3,38	8,70	-	12,78	
		flox	15	10,44	5,97	7,14	-	13,74	n.s.
	Tag 10	WT	13	12,83	4,98	9,82	-	15,84	
		flox	15	11,75	3,23	9,97	-	13,54	n.s.
	Tag 15	WT	13	12,84	3,29	10,85	-	14,82	
		flox	15	12,30	4,54	9,79	-	14,82	n.s.
	Gesamt	Total	84	11,80	4,35	10,85	-	12,74	n.s.
PC38.4	Tag 5	WT	13	30,89	9,55	25,12	-	36,66	
		flox	15	30,59	16,96	21,20	-	39,98	n.s.
	Tag 10	WT	13	44,02	15,28	34,78	-	53,25	
		flox	15	38,75	10,31	33,04	-	44,46	n.s.
	Tag 15	WT	13	50,30	14,06	41,80	-	58,79	
		flox	15	45,35	17,56	35,62	-	55,07	n.s.
	Gesamt	Total	84	39,86	15,73	36,44	-	43,27	n.s.
PC38.3	Tag 5	WT	13	6,85	2,66	5,24	-	8,46	
		flox	15	7,01	3,77	4,92	-	9,09	n.s.
	Tag 10	WT	13	11,60	4,53	8,87	-	14,34	
		flox	15	10,63	2,35	9,33	-	11,93	n.s.
	Tag 15	WT	13	13,41	3,34	11,40	-	15,43	
		flox	15	12,80	4,88	10,10	-	15,51	n.s.
	Gesamt	Total	84	10,37	4,44	9,40	-	11,33	n.s.
PC38.2	Tag 5	WT	13	3,03	1,25	2,27	-	3,78	
		flox	15	2,68	2,29	1,41	-	3,95	n.s.
	Tag 10	WT	13	3,40	1,56	2,46	-	4,35	
		flox	15	3,02	1,41	2,24	-	3,80	n.s.
	Tag 15	WT	13	3,88	0,83	3,38	-	4,38	
		flox	15	3,35	1,46	2,54	-	4,15	n.s.
	Gesamt	Total	84	3,21	1,55	2,88	-	3,55	n.s.
PC38.1	Tag 5	WT	13	2,63	1,07	1,99	-	3,28	
		flox	15	2,70	2,27	1,44	-	3,96	n.s.
	Tag 10	WT	13	2,28	1,65	1,29	-	3,28	
		flox	15	2,00	1,22	1,32	-	2,67	n.s.
	Tag 15	WT	13	2,59	1,15	1,90	-	3,29	
		flox	15	2,16	0,93	1,65	-	2,68	n.s.
	Gesamt	Total	84	2,39	1,45	2,07	-	2,70	n.s.
PC40.6	Tag 5	WT	13	4,04	1,30	3,25	-	4,82	

	Tag 10	flox	15	3,63	1,96	2,55	-	4,72	n.s.
		WT	13	4,34	1,27	3,57	-	5,11	
	Tag 15	flox	15	3,63	1,03	3,06	-	4,20	n.s.
		WT	13	4,38	1,18	3,66	-	5,09	
	Gesamt	flox	15	4,05	1,59	3,17	-	4,93	n.s.
		Total	84	3,99	1,42	3,68	-	4,30	n.s.
PC40.5	Tag 5	WT	13	1,42	0,44	1,15	-	1,68	
		flox	15	1,36	0,62	1,01	-	1,70	n.s.
	Tag 10	WT	13	1,66	0,61	1,29	-	2,03	
		flox	15	1,47	0,29	1,31	-	1,63	n.s.
	Tag 15	WT	13	1,87	0,47	1,59	-	2,15	
		flox	15	1,64	0,51	1,35	-	1,92	n.s.
	Gesamt	Total	84	1,56	0,52	1,45	-	1,68	n.s.
	Tag 5	WT	13	0,71	0,21	0,59	-	0,84	
		flox	15	0,67	0,34	0,48	-	0,86	n.s.
PC40.4	Tag 10	WT	13	0,84	0,27	0,68	-	1,00	
		flox	15	0,79	0,19	0,69	-	0,89	n.s.
	Tag 15	WT	13	0,97	0,22	0,84	-	1,10	
		flox	15	0,92	0,40	0,70	-	1,15	n.s.
	Gesamt	Total	84	0,82	0,30	0,75	-	0,88	n.s.
PCgesamt	Tag 5	WT	13	653,18	182,92	542,64	-	763,71	
		flox	15	650,65	355,55	453,75	-	847,55	n.s.
	Tag 10	WT	13	726,26	273,05	561,26	-	891,26	
		flox	15	659,31	150,81	575,80	-	742,83	n.s.
	Tag 15	WT	13	718,96	151,27	627,55	-	810,37	
		flox	15	691,65	229,28	564,67	-	818,62	n.s.
	Gesamt	Total	84	682,18	232,14	631,80	-	732,56	n.s.
	Tag 5	WT	13	653,18	182,92	542,64	-	763,71	
		flox	15	650,65	355,55	453,75	-	847,55	n.s.

Tabelle 16: Phosphatidylcholin-Subspezies in % Cholesterin

Phospholipid	Gruppe	Genotyp	n	Mittelwert	SD	95% CI	p-Wert
PC30.1	Tag 5	WT	13	,39	,68	-,02 - ,80	
		flox	15	,31	,86	-,17 - ,78	n.s.
	Tag 10	WT	13	,17	,28	,01 - ,34	
		flox	15	,18	,36	-,02 - ,38	n.s.
	Tag 15	WT	13	,23	,34	,03 - ,44	
		flox	15	,38	,50	,10 - ,66	n.s.
	Gesamt	Total	84	,28	,54	,16 - ,39	n.s.
	Tag 5	WT	13	26,86	8,19	21,91 - 31,81	
		flox	15	22,19	11,47	15,84 - 28,54	n.s.
PC30.0	Tag 10	WT	13	30,32	9,37	24,66 - 35,98	
		flox	15	24,64	9,03	19,64 - 29,64	n.s.
	Tag 15	WT	13	36,85	10,00	30,80 - 42,89	
		flox	15	29,41	12,25	22,62 - 36,20	n.s.
	Gesamt	Total	84	28,17	10,95	25,79 - 30,54	0,006
PC32.2	Tag 5	WT	13	4,54	1,42	3,67 - 5,40	
		flox	15	4,54	1,42	3,67 - 5,40	

		flox	15	3,75	2,16	2,56	-	4,95	n.s.
	Tag 10	WT	13	6,55	2,24	5,19	-	7,90	
		flox	15	4,50	1,72	3,55	-	5,45	0,013
	Tag 15	WT	13	7,48	2,10	6,21	-	8,75	
		flox	15	6,30	3,52	4,35	-	8,25	n.s.
	Gesamt	Total	84	5,47	2,61	4,91	-	6,04	0,003
PC32.1	Tag 5	WT	13	16,81	4,89	13,85	-	19,76	
		flox	15	14,95	7,26	10,92	-	18,97	n.s.
	Tag 10	WT	13	14,16	5,05	11,11	-	17,22	
		flox	15	12,24	3,62	10,24	-	14,25	n.s.
	Tag 15	WT	13	13,39	4,00	10,98	-	15,81	
		flox	15	12,44	4,13	10,15	-	14,73	n.s.
	Gesamt	Total	84	13,94	5,09	12,84	-	15,05	0,061
PC32.0	Tag 5	WT	13	80,76	25,46	65,37	-	96,14	
		flox	15	74,48	24,40	60,97	-	87,99	n.s.
	Tag 10	WT	13	84,57	27,26	68,10	-	101,04	
		flox	15	82,06	25,25	68,07	-	96,04	n.s.
	Tag 15	WT	13	92,42	24,88	77,38	-	107,46	
		flox	15	84,62	29,52	68,27	-	100,96	n.s.
	Gesamt	Total	84	82,95	25,97	77,32	-	88,59	n.s.
PC34.3	Tag 5	WT	13	4,43	1,43	3,57	-	5,30	
		flox	15	4,03	1,63	3,13	-	4,93	n.s.
	Tag 10	WT	13	4,74	1,69	3,73	-	5,76	
		flox	15	3,97	1,06	3,39	-	4,56	n.s.
	Tag 15	WT	13	4,90	1,40	4,05	-	5,75	
		flox	15	4,59	1,90	3,54	-	5,64	n.s.
	Gesamt	Total	84	4,43	1,54	4,09	-	4,76	0,065
PC34.2	Tag 5	WT	13	75,69	22,59	62,04	-	89,34	
		flox	15	67,50	22,37	55,11	-	79,88	n.s.
	Tag 10	WT	13	92,96	33,01	73,01	-	112,90	
		flox	15	78,86	21,33	67,05	-	90,67	n.s.
	Tag 15	WT	13	101,79	28,69	84,45	-	119,13	
		flox	15	90,81	35,48	71,16	-	110,46	n.s.
	Gesamt	Total	84	84,20	29,31	77,84	-	90,56	0,065
PC34.1	Tag 5	WT	13	41,81	10,26	35,61	-	48,01	
		flox	15	37,52	13,61	29,98	-	45,05	n.s.
	Tag 10	WT	13	49,88	18,73	38,56	-	61,20	
		flox	15	44,18	11,29	37,93	-	50,44	n.s.
	Tag 15	WT	13	52,56	16,13	42,81	-	62,31	
		flox	15	48,23	14,11	40,41	-	56,05	n.s.
	Gesamt	Total	84	45,53	14,70	42,34	-	48,72	n.s.
PC34.0	Tag 5	WT	13	14,04	3,76	11,77	-	16,31	
		flox	15	12,94	3,76	10,86	-	15,03	n.s.
	Tag 10	WT	13	25,48	10,55	19,11	-	31,86	
		flox	15	22,69	6,78	18,93	-	26,44	n.s.
	Tag 15	WT	13	31,31	10,74	24,82	-	37,80	
		flox	15	26,11	8,03	21,66	-	30,55	n.s.

	Gesamt	Total	84	21,99	9,96	19,82	-	24,15	n.s.
PC36.5	Tag 5	WT	13	2,04	,67	1,64	-	2,45	n.s.
		flox	15	1,93	,86	1,46	-	2,41	
	Tag 10	WT	13	2,47	,82	1,97	-	2,96	n.s.
		flox	15	2,14	,75	1,73	-	2,56	
	Tag 15	WT	13	2,57	,73	2,13	-	3,02	n.s.
		flox	15	2,53	1,18	1,87	-	3,19	
	Gesamt	Total	84	2,28	,87	2,09	-	2,47	n.s.
PC36.4	Tag 5	WT	13	21,21	6,27	17,42	-	25,00	n.s.
		flox	15	18,63	7,28	14,60	-	22,66	
	Tag 10	WT	13	26,39	8,87	21,03	-	31,75	n.s.
		flox	15	22,88	7,54	18,71	-	27,06	
	Tag 15	WT	13	30,95	10,36	24,68	-	37,21	n.s.
		flox	15	27,17	12,47	20,26	-	34,08	
	Gesamt	Total	84	24,42	9,70	22,32	-	26,53	n.s.
PC36.3	Tag 5	WT	13	21,86	6,18	18,12	-	25,59	n.s.
		flox	15	19,22	6,21	15,78	-	22,65	
	Tag 10	WT	13	29,42	10,76	22,91	-	35,92	n.s.
		flox	15	24,74	6,06	21,38	-	28,09	
	Tag 15	WT	13	33,07	11,27	26,26	-	39,88	n.s.
		flox	15	28,77	11,30	22,51	-	35,03	
	Gesamt	Total	84	26,04	9,86	23,90	-	28,18	n.s.
PC36.2	Tag 5	WT	13	66,14	17,35	55,66	-	76,63	n.s.
		flox	15	59,23	19,38	48,49	-	69,96	
	Tag 10	WT	13	107,87	36,33	85,92	-	129,83	n.s.
		flox	15	90,23	24,35	76,74	-	103,71	
	Tag 15	WT	13	147,01	43,00	121,02	-	172,99	n.s.
		flox	15	124,72	50,38	96,82	-	152,62	
	Gesamt	Total	84	98,64	45,33	88,80	-	108,48	n.s.
PC36.1	Tag 5	WT	13	8,17	2,09	6,91	-	9,44	n.s.
		flox	15	7,56	2,65	6,09	-	9,02	
	Tag 10	WT	13	12,71	4,98	9,70	-	15,72	n.s.
		flox	15	10,92	2,85	9,35	-	12,50	
	Tag 15	WT	13	15,04	3,67	12,82	-	17,25	n.s.
		flox	15	13,82	3,80	11,71	-	15,92	
	Gesamt	Total	84	11,33	4,34	10,38	-	12,27	n.s.
PC36.0	Tag 5	WT	13	1,38	,52	1,06	-	1,69	n.s.
		flox	15	1,23	,52	,95	-	1,52	
	Tag 10	WT	13	1,74	,80	1,25	-	2,22	n.s.
		flox	15	1,52	,41	1,29	-	1,74	
	Tag 15	WT	13	2,54	,90	1,99	-	3,08	n.s.
		flox	15	2,04	,62	1,70	-	2,38	
	Gesamt	Total	84	1,73	,76	1,57	-	1,90	n.s.
PC38.6	Tag 5	WT	13	4,55	1,34	3,74	-	5,35	n.s.
		flox	15	4,00	1,51	3,16	-	4,83	
	Tag 10	WT	13	5,22	1,75	4,17	-	6,28	n.s.
		flox	15	4,29	1,53	3,44	-	5,13	

	Tag 15	WT	13	5,38	1,75	4,32	-	6,44	
		flox	15	4,83	2,33	3,54	-	6,12	
	Gesamt	Total	84	4,69	1,76	4,31	-	5,07	n.s.
PC38.5	Tag 5	WT	13	7,18	2,03	5,96	-	8,41	
		flox	15	6,29	2,46	4,93	-	7,66	
	Tag 10	WT	13	10,05	3,93	7,68	-	12,42	
		flox	15	8,91	3,19	7,14	-	10,68	
	Tag 15	WT	13	12,19	4,40	9,53	-	14,85	
		flox	15	10,47	4,47	8,00	-	12,94	
	Gesamt	Total	84	9,14	3,96	8,28	-	10,00	n.s.
PC38.4	Tag 5	WT	13	20,73	5,95	17,13	-	24,32	
		flox	15	18,40	6,84	14,61	-	22,19	
	Tag 10	WT	13	34,72	12,61	27,10	-	42,34	
		flox	15	29,58	10,93	23,52	-	35,63	
	Tag 15	WT	13	47,97	17,85	37,18	-	58,75	
		flox	15	39,12	19,13	28,53	-	49,72	
	Gesamt	Total	84	31,56	16,38	28,00	-	35,11	n.s.
PC38.3	Tag 5	WT	13	4,54	1,21	3,81	-	5,27	
		flox	15	4,29	1,53	3,44	-	5,14	
	Tag 10	WT	13	9,14	3,35	7,12	-	11,17	
		flox	15	8,00	2,23	6,76	-	9,23	
	Tag 15	WT	13	12,69	4,16	10,18	-	15,20	
		flox	15	10,83	4,42	8,39	-	13,28	
	Gesamt	Total	84	8,21	4,27	7,28	-	9,14	n.s.
PC38.2	Tag 5	WT	13	2,18	1,41	1,32	-	3,03	
		flox	15	1,53	1,10	,92	-	2,14	
	Tag 10	WT	13	2,77	1,33	1,96	-	3,58	
		flox	15	2,22	,97	1,69	-	2,76	
	Tag 15	WT	13	3,86	1,83	2,75	-	4,96	
		flox	15	2,84	1,32	2,11	-	3,57	
	Gesamt	Total	84	2,54	1,48	2,22	-	2,86	n.s.
PC38.1	Tag 5	WT	13	1,85	,79	1,38	-	2,33	
		flox	15	1,61	1,15	,98	-	2,25	
	Tag 10	WT	13	1,80	,90	1,25	-	2,34	
		flox	15	1,38	,63	1,03	-	1,73	
	Tag 15	WT	13	2,34	1,04	1,72	-	2,97	
		flox	15	1,78	,61	1,44	-	2,12	
	Gesamt	Total	84	1,78	,89	1,59	-	1,97	n.s.
PC40.6	Tag 5	WT	13	2,69	,74	2,25	-	3,14	
		flox	15	2,20	,77	1,77	-	2,62	
	Tag 10	WT	13	3,48	1,30	2,70	-	4,26	
		flox	15	2,75	1,00	2,19	-	3,31	
	Tag 15	WT	13	4,18	1,61	3,20	-	5,15	
		flox	15	3,48	1,70	2,54	-	4,41	
	Gesamt	Total	84	3,11	1,37	2,81	-	3,40	n.s.
PC40.5	Tag 5	WT	13	,95	,24	,80	-	1,09	
		flox	15	,83	,22	,71	-	,95	

	Tag 10	WT	13	1,28	,41	1,03	-	1,53	n.s.
		flox	15	1,11	,31	,94	-	1,29	
	Tag 15	WT	13	1,78	,66	1,38	-	2,17	n.s.
		flox	15	1,40	,54	1,11	-	1,70	
	Gesamt	Total	84	1,22	,51	1,11	-	1,33	n.s.
PC40.4	Tag 5	WT	13	,48	,14	,40	-	,56	n.s.
		flox	15	,42	,15	,33	-	,50	
	Tag 10	WT	13	,67	,26	,52	-	,83	n.s.
		flox	15	,59	,18	,49	-	,69	
	Tag 15	WT	13	,92	,31	,73	-	1,11	n.s.
		flox	15	,77	,33	,59	-	,96	
	Gesamt	Total	84	,64	,29	,58	-	,70	n.s.
PCgesamt	Tag 5	WT	13	440,14	118,76	368,37	-	511,91	n.s.
		flox	15	393,23	135,65	318,11	-	468,35	
	Tag 10	WT	13	568,23	184,46	456,76	-	679,70	n.s.
		flox	15	492,61	129,73	420,77	-	564,45	
	Tag 15	WT	13	674,44	189,31	560,04	-	788,84	n.s.
		flox	15	586,95	214,88	467,96	-	705,95	
	Gesamt	Total	84	523,43	186,57	482,95	-	563,92	n.s.

7.4. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP binding cassette transporter
ATP	Adenosin-5'-monophosphat
bp	Basenpaare
Chol	Cholesterin
cDNA	komplemenäre DNA (complementary DNA)
Cer	Ceramid
CLD	zytoplasmatisches Fetttröpfchen (cytoplasmic lipid droplet)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleid acid)
Dnase	Desoxyribonuclease
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	Stunde(n) (hour)
IgA	Immunglobulin A
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LPC	Lysophosphatidylcholin
MFG	Milchfetttröpfchen (milk fat globule)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (messenger ribonucleid acid)
NBD	Nukleotid bindende Domäne

oBLG-Promoter	oviner Betalaktoglobulin-Promoter
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid(e)
Plasm	Plasmalogen
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	quantitative Real time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SPM	Sphingomyelin
TMD	Transmembrandomäne
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
ZVH	Zentrale Versuchstierhaltung

7.5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Milch von C57/Bl6J Mäusen [Meier 1965].....	11
Tabelle 2: Überblick über die Lipidzusammensetzung der MFGM in Prozent der Gesamtlipide in Kuhmilch [Fong 2007]:.....	14
Tabelle 3: Übersicht der wichtigsten ABC-Transporter mit Expression und assoziierten Krankheiten.....	19
Tabelle 4: Verpaarungsschema	32
Tabelle 5: Primer zur Genotypisierung und Flox-Nachweis:	42
Tabelle 6: Primer qPCR	44
Tabelle 7: Quantitative Expressionslevel von <i>Abca3</i> mRNA im Mammagewebe von Wildtyp Mäusen und geflochten Mäusen.....	52
Tabelle 8: Relative Genexpression von <i>Abca1</i> , <i>Abca7</i> , <i>Abcg1</i> , <i>Srebp1</i> , <i>Srebp2</i>	53
Tabelle 9: Anzahl der gemolkten Zitzen.....	56
Tabelle 10: Anzahl der geworfenen Pups	56
Tabelle 11: Milchmenge in μl	58
Tabelle 12: Gewicht des Wurfes in Gramm an Tag 2, 5, 10 und 15	60
Tabelle 13: Cholesterin in nmol/ml Milch.....	61
Tabelle 14: Gesamt-Phospholipidgehalt der Mausmilch in nmol/ml Milch der Wildtypmilch und der Milch der geflochten Weibchen	64
Tabelle 15: Phosphatidylcholin-Subspezies in nmol/ml Milch	84
Tabelle 16: Phosphatidylcholin-Subspezies in % Cholesterin.....	88

7.6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1: Lokalisation und Nummerierung der fünf Brustdrüsenpaare der Maus	7
Abbildung 1.1-2: Vergleich menschlicher und muriner Brustdrüse	8
Abbildung 1.1.1-1: Stadien der Milchdrüsenentwicklung der Maus.....	9
Abbildung 1.1.2-1: Schematische Zeichnung eines Alveolus und einer alveolären Epithelzelle...	11
Abbildung 1.1.4-1: Chemische Struktur der Glycerophospholipide	15
Abbildung 1.2.1-1: A schematische Darstellung eines ABC-Transporters mit seinen vier Domänen; B Bänderdarstellung eines ABC-Transporters.....	18
Abbildung 1.2.3-1: schematische Darstellung eines ABC-Transporters	20
Abbildung 1.4.1-1: <i>Cre/loxP</i> -vermittelte Exzision von DNA.....	25
Abbildung 1.4.1-2: Konditionale und konventionelle Deletion von Mausgenen	26
Abbildung 3.1.1-1: Ohrloch-Stanzschema.....	31
Abbildung 3.1.3.1-1: Schema der Melkvorrichtung.....	34
Abbildung 3.1.3.1-2: Foto der Melkvorrichtung.....	35
Abbildung 3.1.3.2-1: Zwei Fotos der Melkvorrichtung in Anwendung.....	36
Abbildung 4.1.1-1: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der NEO-PCR.....	48
Abbildung 4.1.1-2: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der Flox-PCR.....	49
Abbildung 4.1.1-3: Gelelektrophorese der DNA-Produkte der BLG-cre-PCR	49
Abbildung 4.1.2-1: Schematischer Ausschnitt aus dem geflochten <i>Abca3</i> -Allel	51

Abbildung 4.1.2-2: Gelbild der PCR zum Nachweis des Floxens	51
Abbildung 4.1.3-1: Relative mRNA-Level von <i>Abca3</i> bezogen auf das Housekeeping-Gen <i>HPRT</i>	53
Abbildung 4.3.1-1: Laktationskurve von Mäusen.....	57
Abbildung 4.3.1-2: Milchmenge in μ l	59
Abbildung 4.3.2-1: Gewicht des Wurfes an Tag 2, 5, 10 und 15	60
Abbildung 4.4.1-1: Cholesterin in nmol/ml Milch	62
Abbildung 4.4.2-1: Phospholipidzusammensetzung der Wildtyp-Mausmilch	63
Abbildung 4.4.2.1-1: Phospholipidwerte in nmol/ml Milch	64
Abbildung 4.4.2.1-2: Darstellung der Phospholipide	65
Abbildung 4.4.2.2-1: Graphische Darstellung der einzelnen Subspezies von PC im Vergleich....	66
Abbildung 4.4.2.2-2: Darstellung der kurzkettigen PC	67
Abbildung 4.4.2.2-3: Diagramm der kurzkettigen PC	67
Abbildung 5.7-1: Genregulation von ABCA3 in der Lunge	74

8. Literaturverzeichnis

- Abe-Dohmae, S. (2003): Human ABCA7 Supports Apolipoprotein-mediated Release of Cellular Cholesterol and Phospholipid to Generate High Density Lipoprotein. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (1), S. 604–611.
- Agrawal, Amit; Hamvas, Aaron; Cole, F. Sessions; Wambach, Jennifer A.; Wegner, Daniel; Coghill, Carl et al. (2012): An intronic ABCA3 mutation that is responsible for respiratory disease. In: *Pediatr Res* 71 (6), S. 633–637.
- Albrecht, C.; Viturro, E. (2007): The ABCA subfamily-gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 453 (5), S. 581–589.
- Anderson, Steven M.; Rudolph, Michael C.; McManaman, James L.; Neville, Margaret C. (2007): Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! In: *Breast Cancer Res* 9 (1), S. 204.
- Aoki, Naohito (2006): Regulation and Functional Relevance of Milk Fat Globules and Their Components in the Mammary Gland. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem* 70 (9), S. 2019–2027.
- Armand, M.; Hamosh, M.; Mehta, N. R.; Angelus, P. A.; Philpott, J. R.; Henderson, T. R. et al. (1996): Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. In: *Pediatr Res* 40 (3), S. 429–437.
- Aung, T.; Chapuy, B.; Vogel, D.; Wenzel, D.; Oppermann, M.; Lahmann, M. et al. (2011): Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Baldan, A. (2006): Deletion of the Transmembrane Transporter ABCG1 Results in Progressive Pulmonary Lipidosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (39), S. 29401–29410.
- Ban, N.; Matsumura, Y.; Sakai, H.; Takanezawa, Y.; Sasaki, M.; Arai, H.; Inagaki, N. (2007): ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (13), S. 9628–9634.
- Barash, I.; Faerman, A.; Richenstein, M.; Kari, R. (1999): In vivo and in vitro expression of human serum albumin genomic sequences in mammary epithelial cells with [bgr]-lactoglobulin and whey acidic protein promoters. Hg. v. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* 52:241–252.
- Bawden, W. S.; Passey, R. J.; Mackinlay, A. G. (1994): The genes encoding the major milk-specific proteins and their use in transgenic studies and protein engineering. In: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev* 12, S. 89–137.

Berg, Jeremy M.; Häcker, Bärbel; Stryer, Lubert; Tymoczko, John L. (2010): Biochemie. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

Besnard, V.; Matsuzaki, Y.; Clark, J.; Xu, Y.; Wert, S. E.; Ikegami, M. et al. (2010): Conditional deletion of Abca3 in alveolar type II cells alters surfactant homeostasis in newborn and adult mice. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 298 (5), S. 46-59.

Besnard, V.; Xu, Y.; Whitsett, J. A. (2007): Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293 (6), S. 395-405.

Brasch, F.; Schimanski, S.; Muhlfeld, C.; Barlage, S.; Langmann, T.; Aslanidis, C. et al. (2006): Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 174 (5), S. 571–580.

Buchman, A. L.; Ament, M. E.; Sohel, M.; Dubin, M.; Jenden, D. J.; Roch, M. et al. (2001): Choline deficiency causes reversible hepatic abnormalities in patients receiving parenteral nutrition: proof of a human choline requirement: a placebo-controlled trial. In: *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 25 (5), S. 260–268.

Bullard, J. E.; Wert, S. E.; Noguee, L. M. (2006): ABCA3 deficiency: neonatal respiratory failure and interstitial lung disease. In: *Seminars in perinatology* 30 (6), S. 327–334.

Bullard, J. E.; Wert, S. E.; Whitsett, J. A.; Dean, M.; Noguee, L. M. (2005): ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 172 (8), S. 1026–1031.

Carlson, S. E.; Montalto, M. B.; Ponder, D. L.; Werkman, S. H.; Korones, S. B. (1998): Lower incidence of necrotizing enterocolitis in infants fed a preterm formula with egg phospholipids. In: *Pediatr. Res* 44 (4), S. 491–498.

Cavelier, Clara; Lorenzi, Iris; Rohrer, Lucia; von, EckardsteinArnold (2006): Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (7), S. 655–666.

Chapuy, B.; Koch, R.; Radunski, U.; Corsham, S.; Cheong, N.; Inagaki, N. et al. (2008): Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. In: *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 22 (8), S. 1576–1586.

Chapuy, B.; Panse, M.; Radunski, U.; Koch, R.; Wenzel, D.; Inagaki, N. et al. (2009): ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. In: *Haematologica* 94 (11), S. 1528–1536.

- Cheong, N.; Madesh, M.; Gonzales, L. W.; Zhao, M.; Yu, K.; Ballard, P. L.; Shuman, H. (2006): Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (14), S. 9791–9800
- Cheong, N.; Zhang, H.; Madesh, M.; Zhao, M.; Yu, K.; Dodia, C. et al. (2007): ABCA3 is critical for lamellar body biogenesis in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (33), S. 23811–23817.
- Clark, A. J.; Archibald, A. L.; McClenaghan, M.; Simons, J. P.; Wallace, R.; Whitelaw, C. B. A. (1993): Enhancing the Efficiency of Transgene Expression. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 339 (1288), S. 225–232.
- Connors, Timothy D.; van Raay, Terence J.; Petry, Linda R.; Klinger, Katherine W.; Landes, Gregory M.; Burn, Timothy C. (1997): The Cloning of a Human ABC Gene (ABC3) Mapping to Chromosome 16p13.3. In: *Genomics* 39 (2), S. 231–234.
- Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. In: *J. Lipid Res* 42 (7), S. 1007–1017.
- DePeters, Edward J.; Hovey, Russell C. (2009): Methods for Collecting Milk from Mice. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14 (4), S. 397–400.
- Dewettinck, Koen; Rombaut, Roeland; Thienpont, Natacha; Le, Thien Trung; Messens, Kathy; van Camp, John (2008): Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. In: *International Dairy Journal* 18 (5), S. 436–457.
- Evers, Jaap M. (2004): The milkfat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. In: *International Dairy Journal* 14 (8), S. 661–674.
- Farke, Carolin; Meyer, Heinrich H. D.; Bruckmaier, Rupert M.; Albrecht, Christiane (2008): Differential expression of ABC transporters and their regulatory genes during lactation and dry period in bovine mammary tissue. In: *J. Dairy Res.* 75 (04), S. 406.
- Feil, R.; Brocard, J.; Mascres, B.; LeMeur, M.; Metzger, D.; Chambon, P. (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (20), S. 10887–10890.
- Feng, Y.; Manka, D.; Wagner, K.-U; Khan, S. A. (2007): Estrogen receptor- expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (37), S. 14718–14723.
- Fitzgerald, M. L.; Xavier, R.; Haley, K. J.; Welte, R.; Goss, J. L.; Brown, C. E. et al. (2007): ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. In: *Journal of lipid research* 48 (3), S. 621–632.

Flamein, F.; Riffault, L.; Muselet-Charlier, C.; Pernelle, J.; Feldmann, D.; Jonard, L. et al. (2012): Molecular and cellular characteristics of ABCA3 mutations associated with diffuse parenchymal lung diseases in children. In: *Human Molecular Genetics* 21 (4), S. 765–775.

Fong, Bertram Y.; Norris, Carmen S.; MacGibbon, Alastair K.H (2007): Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. In: *International Dairy Journal* 17 (4), S. 275–288.

Fortunato, Donatella; Giuffrida, Maria Gabriella; Cavaletto, Maria; Garoffo, Lorenza Perono; Dellavalle, Giuseppina; Napolitano, Lorenzo et al. (2003): Structural proteome of human colostrum fat globule membrane proteins. In: *Proteomics* 3 (6), S. 897–905.

Gallier, Sophie; Gragson, Derek; Jiménez-Flores, Rafael; Everett, David (2010): Using Confocal Laser Scanning Microscopy To Probe the Milk Fat Globule Membrane and Associated Proteins. In: *J. Agric. Food Chem.* 58 (7), S. 4250–4257.

Garmany, T. H.; Moxley, M. A.; White, F. V.; Dean, M.; Hull, W. M.; Whitsett, J. A. et al. (2006): Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. In: *Pediatric research* 59 (6), S. 801–805.

Görs, S.; Kucia, M.; Langhammer, M.; Junghans, P.; Metges, C. C. (2009): Technical note: Milk composition in mice--methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. In: *J. Dairy Sci* 92 (2), S. 632–637.

Gros, Philippe; Neriah, Yinon Ben; Croop, James M.; Housman, David E. (1986): Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. In: *Nature* 323 (6090), S. 728–731.

Günzburg, W. H.; Salmons, B.; Zimmermann, B.; Müller, M.; Erfle, V.; Brem, G. (1991): A Mammary-Specific Promoter Directs Expression of Growth Hormone not only to the Mammary Gland, but also to Bergman Glia Cells in Transgenic Mice. In: *Molecular Endocrinology* 5 (1), S. 123–133.

Guo, Y.; Cordes, K. R.; Farese, R. V.; Walther, T. C. (2009): Lipid droplets at a glance. In: *Journal of Cell Science* 122 (6), S. 749–752.

Hackbarth, Hansjoachim; van Zutphen, Lambertus Franciscus Maria (1995): Grundlagen der Versuchstierkunde. Ein Beitrag zum tierschutzgerechten Umgang mit Versuchstieren und zur Qualität tierexperimenteller Ergebnisse. 1. Aufl. Stuttgart [u.a.]: G. Fischer, S. 6-35

Hallman, M. (2004): Lung surfactant, respiratory failure, and genes. In: *The New England journal of medicine* 350 (13), S. 1278–1280.

Hammel, M.; Michel, G.; Hoefer, C.; Klatfen, M.; Müller-Höcker, J.; Angelis, M. H. de; Holzinger, A. (2007): Targeted inactivation of the murine Abca3 gene leads to respiratory

failure in newborns with defective lamellar bodies. In: *Biochemical and biophysical research communications* 359 (4), S. 947–951.

Hamosh, Margrit; Peterson, Jerry A.; Henderson, Theresa R.; Scallan, Ciaran D.; Kiwan, Radwin; Ceriani, Roberto L. et al. (1999): Protective function of human milk: The milk fat globule. In: *Seminars in Perinatology* 23 (3), S. 242–249.

Hamvas, A. (2010): Evaluation and management of inherited disorders of surfactant metabolism. In: *Chinese medical journal* 123 (20), S. 2943–2947.

Han, L. Q.; Yang, G. Y.; Zhu, H. S.; Wang, Y. Y.; Wang, L. F.; Guo, Y. J. et al. (2010): Selection and use of reference genes in mouse mammary glands. In: *Genet. Mol. Res* 9 (1), S. 449–456.

Hartl, D.; Griesse, M. (2005): Interstitial lung disease in children -- genetic background and associated phenotypes. In: *Respiratory research* 6, S. 32.

Hayden, Michael R.; Brooks-Wilson, Angela; Marcil, Michel; Clee, Susanne M.; Zhang, Lin-Hua; Roomp, Kirsten et al. (1999): Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. In: *Nat. Genet.* 22 (4), S. 336–345.

Heid, HansW; Keenan, ThomasW (2005): Intracellular origin and secretion of milk fat globules. In: *Eur J Cell Biol* 84 (2-3), S. 245–258.

Hennighausen, Lothar; Robinson, Gertraud W. (2005): Information networks in the mammary gland. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (9), S. 715–725.

Higgins, C. F. (1992): ABC Transporters: From Microorganisms to Man. In: *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8 (1), S. 67–113.

Higgins, Christopher F.; Linton, Kenneth J. (2004): The ATP switch model for ABC transporters. In: *Nat Struct Mol Biol* 11 (10), S. 918–926.

Hintze, Korry J.; Snow, D.; Burtenshaw, I.; Ward R. E. (2011): Nutraceutical Properties of Milk Fat Globular Membrane. In: Magdy Elnashar (Hg.): *Biotechnology of Biopolymers: InTech*, S. 321–341.

Hollenstein, Kaspar; Dawson, Roger J. P.; Locher, Kaspar P. (2007): Structure and mechanism of ABC transporter proteins. In: *Curr. Opin. Struct. Biol* 17 (4), S. 412–418.

Horton, J. D. (2003): Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (21), S. 12027–12032.

<http://tvmouse.compmed.ucdavis.edu/bcancercd/22/index.html>

- Huls, M.; van den Heuvel, J. J.; Dijkman, H. B.; Russel, F. G.; Masereeuw, R. (2006): ABC transporter expression profiling after ischemic reperfusion injury in mouse kidney. In: *Kidney international* 69 (12), S. 2186–2193.
- Isaacs, C. E. (2001): The antimicrobial function of milk lipids. In: *Adv Nutr Res* 10, S. 271–285.
- Isaacs, C. E. (2005): Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. In: *J Nutr* 135 (5), S. 1286–1288.
- Jara-Almonte, M.; White, J. M. (1972): Milk production in laboratory mice. In: *J. Dairy Sci* 55 (10), S. 1502–1505.
- Jones, P. M.; George, A. M. (2004): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61 (6), S. 682–699.
- Kaminski, W. E.; Piehler, A.; Wenzel, J. J. (2006): ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1762 (5), S. 510–524.
- Kaminski, Wolfgang E.; Ors6, Evelyn; Diederich, Wendy; Klucken, Jochen; Drobnik, Wolfgang; Schmitz, Gerd (2000): Identification of a Novel Human Sterol-Sensitive ATP-Binding Cassette Transporter (ABCA7). In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (2), S. 532–538.
- Klappe, Karin; Hummel, Ina; Hoekstra, Dick; Kok, Jan Willem (2009): Lipid dependence of ABC transporter localization and function. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 161 (2), S. 57–64.
- Klugbauer, N. (1996): Primary structure of a novel ABC transporter with a chromosomal localization on the band encoding the multidrug resistance-associated protein. In: *FEBS Letters* 391 (1-2), S. 61–65.
- Kobayashi, A. (2006): Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. In: *The Journal of Lipid Research* 47 (8), S. 1791–1802.
- Kokkalis, G. V., Vinson, W. E. and R. M. Akers (1986): Use of Laboratory Mice to Study Genetic Relationships Among Milk Yield and Number of Somatic Cells. In: *Journal of Dairy Science* (69), S. 1426–1431,
- Kühn, R.; Schwenk, F.; Aguet, M.; Rajewsky, K. (1995): Inducible gene targeting in mice. In: *Science* 269 (5229), S. 1427–1429.
- Lewandoski, M. (2001): Conditional control of gene expression in the mouse. In: *Nat. Rev. Genet* 2 (10), S. 743–755.

- Li, Yi; Rosen, Jeffrey M. (2005): Stem/Progenitor Cells in Mouse Mammary Gland Development and Breast Cancer. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10 (1), S. 17–24.
- Lin, C. Y.; Strom, A.; Vega, V. B.; Kong, S. L.; Yeo, A. L.; Thomsen, J. S. et al. (2004): Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. In: *Genome biology* 5 (9), S. R66.
- Locher, Kaspar P. (2009): Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1514), S. 239–245.
- Locher, Kaspar P.; Borths, Elizabeth (2004): ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. In: *FEBS Lett* 564 (3), S. 264–268.
- Lopez, Christelle; Briard-Bion, Valerie; Menard, Olivia; Rousseau, Florence; Pradel, Philippe; Besle, Jean-Michel (2008): Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (13), S. 5226–5236.
- Lopez, Christelle; Ménard, Olivia (2011): Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83 (1), S. 29–41.
- Luciani, M. F.; Denizot, F.; Savary, S.; Mattei, M. G.; Chimini, G. (1994): Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. In: *Genomics* 21 (1), S. 150–159.
- Lukowski, R.; Weber, S.; Weinmeister, P.; Feil, S.; Feil, R. (2005): Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. In: *BIOSpektrum* 11 (3), S. 287–290.
- Mani, O.; Körner, M.; Ontsouka, C. E.; Sorensen, M. T.; Sejrsen, K.; Bruckmaier, R. M.; Albrecht, C. (2011): Identification of ABCA1 and ABCG1 in milk fat globules and mammary cells—Implications for milk cholesterol secretion. In: *Journal of Dairy Science* 94 (3), S. 1265–1276.
- Mani, O.; Korner, M.; Sorensen, M. T.; Sejrsen, K.; Wotzkow, C.; Ontsouka, C. E. et al. (2010): Expression, localization, and functional model of cholesterol transporters in lactating and nonlactating mammary tissues of murine, bovine, and human origin. In: *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299 (2), S. R642.
- Mather, I. H.; Keenan, T. W. (1998): Origin and secretion of milk lipids. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3 (3), S. 259–273.

Mather, I.H; Jack, L.J.W; Madara, P.J; Johnson, V.G (2001): The distribution of MUC1, an apical membrane glycoprotein, in mammary epithelial cells at the resolution of the electron microscope: implications for the mechanism of milk secretion. In: *Cell and Tissue Research* 304 (1), S. 91–101.

Matsuzaki, Y.; Besnard, V.; Clark, J. C.; Xu, Y.; Wert, S. E.; Ikegami, M.; Whitsett, J. A. (2008): STAT3 regulates ABCA3 expression and influences lamellar body formation in alveolar type II cells. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38 (5), S. 551–558.

McManaman, James L.; Neville, Margaret C. (2003): Mammary physiology and milk secretion. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (5), S. 629–641

McNeish, J.; Aiello, R. J.; Guyot, D.; Turi, T.; Gabel, C.; Aldinger, C. et al. (2000): High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (8), S. 4245–4250.

Meier, H.; Hoag, W. G.; McBurney, J. J. (1965): CHEMICAL CHARACTERIZATION OF INBRED-STRAIN MOUSE MILK. I. GROSS COMPOSITION AND AMINO ACID ANALYSIS. In: *The Journal of nutrition* 85, S. 305–308

Mohwald, H. (1990): Phospholipid and Phospholipid-Protein Monolayers at the Air/Water Interface. In: *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41 (1), S. 441–476.

Mulugeta, S.; Gray, J. M.; Notarfrancesco, K. L.; Gonzales, L. W.; Koval, M.; Feinstein, S. I. et al. (2002): Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (25), S. 22147–22155.

Nakamura, Mayuko; Tomita, Akiko; Nakatani, Hajime; Matsuda, Tsukasa; Nadano, Daita (2006): Antioxidant and Antibacterial Genes Are Upregulated in Early Involution of the Mouse Mammary Gland: Sharp Increase of Ceruloplasmin and Lactoferrin in Accumulating Breast Milk. In: *DNA and Cell Biology* 25 (9), S. 491–500.

Neville, Margaret C.; McFadden, Thomas B.; Forsyth, Isabel (2002): Hormonal Regulation of Mammary Differentiation and Milk Secretion. In: *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7 (1), S. 49–66.

Niavarani, Ahmadsreza; Dehghanizadeh, Somaye; Zeinali, Sirous; Karimi, Mohsen; Magliano, Marc; Rassoulzadegan, Minoo (2005): Development of Transgenic Mice Expressing Calcitonin as a Beta-lactoglobulin Fusion Protein in Mammary Gland. In: *Transgenic Res* 14 (5), S. 719–727.

Nishimori, K.; Young, L. J.; Guo, Q.; Wang, Z.; Insel, T. R.; Matzuk, M. M. (1996): Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (21), S. 11699–11704.

Ogg, S. L. (2004): Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (27), S. 10084–10089.

Oskarsson, A. (2004): A method for studies on milk excretion of chemicals in mice with 2,2,4,4,5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) as a model. In: *Toxicology Letters* 151 (2), S. 327–334.

Palmer, Carol A.; Neville, Margaret C.; Anderson, Steven M.; McManaman, James L. (2006): Analysis of Lactation Defects in Transgenic Mice. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11 (3-4), S. 269–282.

Parmar, H. (2004): Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. In: *Endocrine Related Cancer* 11 (3), S. 437–458.

PATTON, S.; KEENAN, T. (1975): The Milk fat globule membrane. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 415 (3), S. 273–309.

Pfaffl, M. W. (2002): Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. In: *Nucleic Acids Research* 30 (9), S. 36.

Quazi, Faraz; Molday, Robert S. (2011): Lipid transport by mammalian ABC proteins. In: *Essays Biochem* 50 (1), S. 265–290.

Ragueneau, S. (1986): A simple method of milk extraction in mice. In: *Physiol. Behav* 38 (3), S. 443–445.

Richert, Monica M. (2000): An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. In: *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 (2), S. 227–241.

Robenek, Horst; Buers, Insa; Hofnagel, Oliver; Robenek, Mirko J.; Troyer, David; Severs, Nicholas J. (2009): Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (6), S. 408–418.

Ronnov-Jessen, L.; Petersen, O. W.; Bissell, M. J. (1996): Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. In: *Physiol Rev* 76 (1), S. 69–125.

Rudolph, M. C.; Monks, J.; Burns, V.; Phistry, M.; Mariani, R.; Foote, M. R. et al. (2010): Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. In: *AJP: Endocrinology and Metabolism* 299 (6), S. E918.

Rudolph, M. C.; Russell, T. D.; Webb, P.; Neville, M. C.; Anderson, S. M. (2011): Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes in vivo in the lactating mammary epithelial cell (6).

Rudolph, Michael C.; Neville, Margaret C.; Anderson, Steven M. (2007): Lipid Synthesis in Lactation: Diet and the Fatty Acid Switch. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12 (4), S. 269–281.

Sano, O.; Kobayashi, A.; Nagao, K.; Kumagai, K.; Kioka, N.; Hanada, K. et al. (2007): Sphingomyelin-dependence of cholesterol efflux mediated by ABCG1. In: *The Journal of Lipid Research* 48 (11), S. 2377–2384.

Sauer, Brian (1998): Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem. In: *Methods* 14 (4), S. 381–392.

Schenkel, Johannes (1995): Transgene Tiere. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Schimanski, S.; Wild, P. J.; Treeck, O.; Horn, F.; Sigrüener, A.; Rudolph, C. et al. (2010): Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. In: *Horm Metab Res* 42 (2), S. 102–109.

Selbert, Stefan; Bentley, Darren J.; Melton, David W.; Rannie, Dominic; Lourenço, Paula; Watson, Christine J.; Clarke, Alan R. (1998): Efficient BLG-Cre mediated gene deletion in the mammary gland. In: *Transgenic Research* 7 (5), S. 387–398.

Shulenin, S.; Noguee, L. M.; Annilo, T.; Wert, S. E.; Whitsett, J. A.; Dean, M. (2004): ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. In: *The New England journal of medicine* 350 (13), S. 1296–1303.

Simons, J. Paul; McClenaghan, M.; Clark, A. John (1987): Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. In: *Nature* 328 (6130), S. 530–532.

Smit, J.J.M.; Schinkel, A.H.; Elferink, R.P.J.Oude; Groen, A.K; Wagenaar, E.; van Deemter, L. et al. (1993): Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. In: *Cell* 75 (3), S. 451–462.

Song, J. H.; Kim, S. H.; Kim, H. J.; Hwang, S. Y.; Kim, T. S. (2008): Alleviation of the drug-resistant phenotype in idarubicin and cytosine arabinoside double-resistant acute myeloid leukemia cells by indomethacin. In: *International journal of oncology* 32 (4), S. 931–936.

Stahlman, M. T.; Besnard, V.; Wert, S. E.; Weaver, T. E.; Dingle, S.; Xu, Y. et al. (2007): Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 55 (1), S. 71–83.

Sternlicht, Mark D.; Kouros-Mehr, Hosein; Lu, Pengfei; Werb, Zena (2006): Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. In: *Differentiation* 74 (7), S. 365–381.

St-Onge, L.; Furth, P. A.; Gruss, P. (1996): Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. In: *Nucleic Acids Res* 24 (19), S. 3875–3877.

Takahashi, K.; Kimura, Y.; Nagata, K.; Yamamoto, A.; Matsuo, M.; Ueda, K. (2005): ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. In: *Medical molecular morphology* 38 (1), S. 2–12.

Tannert, Astrid; Pohl, Antje; Pomorski, Thomas; Herrmann, Andreas (2003): Protein-mediated transbilayer movement of lipids in eukaryotes and prokaryotes: the relevance of ABC transporters. Efflux pumps and antibiotic resistance of microorganisms. In: *International Journal of Antimicrobial Agents* 22 (3), S. 177–187.

Teter (1992): Lactation curves and effect of pup removal on milk fat of C57BI/6J mice fed different diet fats. In: *LIPIDS* 27 (11), S. 912–916,

Ueda, K.; Cardarelli, C.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. (1987): Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84 (9), S. 3004–3008.

Vance, Dennis E.; Vance, Jean E. (2008): Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes (5th Edn.). 5. Aufl. Amsterdam; London: Elsevier.

Wakil, S. J.; Abu-Elheiga, L. A. (2008): Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. In: *The Journal of Lipid Research* 50 (Supplement), S. S138.

Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. S. 537-546.

Whitelaw, C. B.; Harris, S.; McClenaghan, M.; Simons, J. P.; Clark, A. J. (1992): Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. In: *Biochem. J* 286 (Pt 1), S. 31–39.

Whitsett, J. A. (2006): Genetic disorders of surfactant homeostasis. In: *Paediatric respiratory reviews* 7 Suppl 1, S. S240-2.

Yamano, G.; Funahashi, H.; Kawanami, O.; Zhao, L. X.; Ban, N.; Uchida, Y. et al. (2001): ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. In: *FEBS letters* 508 (2), S. 221–225.

Yoshida, I.; Ban, N.; Inagaki, N. (2004): Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoids in lung alveolar type II cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 323 (2), S. 547–555.

Zeisel, S. H. (2000): Choline: needed for normal development of memory. In: *J Am Coll Nutr* 19 (5 Suppl), S. 528S-531S.

Zen, K.; Notarfrancesco, K.; Oorschot, V.; Slot, J. W.; Fisher, A. B.; Shuman, H. (1998): Generation and characterization of monoclonal antibodies to alveolar type II cell lamellar body membrane. In: *Am. J. Physiol* 275 (1 Pt 1), S. L172-83.

Zheng, B.; Sage, M.; Sheppeard, E. A.; Jurecic, V.; Bradley, A. (2000): Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. In: *Mol. Cell. Biol* 20 (2), S. 648–655.

9. Veröffentlichung

Mammaspezifischer Knockout von ABCA3, einem Phospholipidtransporter mit spezifischer Funktion im Lungensurfactantsystem, verändert Milchmenge und -qualität in einem Mausmodell

M. Schicker, R.A. Mittal, M. Hammel, L. Jin, G. Liebisch, G. Schmitz, A. Holzinger

ABCA3 ist als Phospholipidtransporter wesentlich an der Synthese von Lungensurfactant beteiligt, wurde aber auch in Milchdrüsengewebe entdeckt und stellt in Mammakarzinomen einen Marker für eine gute Prognose dar. Die Funktion in der Milchdrüse ist allerdings unbekannt. Milchfetttröpfchen werden in Milchdrüsen-Epithelzellen gebildet, indem Lipidtransporter (z.B auch ABC-Transporter der ABCASubklasse wie ABCA1 oder ABCA7) Lipide importieren.

Wir stellten uns die Frage, ob ABCA3 in der Brustdrüse an der Milchbildung und – sekretion beteiligt ist.

Wir konnten ABCA3 in Milchfetttröpfchen der Maus nachweisen. Daraufhin generierten wir ein Mausmodell mit spezifischer Deletion des ABCA3 Gens in der Milchdrüse, indem wir eine Linie mit Cre Expression unter dem Lactoglobulin-Promotor mit einer Mauslinie kreuzten, welche im ABCA3-Gen LoxP Stellen zur Cre-getriggerten Deletion enthielt. Auf diese Weise wurde das eine Allel gewebespezifisch deletiert, während das andere Allel durch Einkreuzen einer klassischen Knockout-Linie gänzlich inaktiviert wurde.

Wir analysierten Milchproben am Tag 10 und 15 der Laktation. Die Milchmenge am Tag 15 war signifikant vermindert. Die massenspektrometrische Analyse zeigte eine Verminderung von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin, während innerhalb der Phosphatidylcholin-Spezies kurzkettige Moleküle (PC30:0, PC32:0) signifikant vermindert waren.

Der Nachweis von ABCA3 in Milchfetttröpfchen und die Verminderung der Milchmenge bei dessen Fehlen bestätigt eine Rolle dieses Transporters für die Milchsekretion. Da Phospholipide nur einen geringen Anteil der Milchfette darstellen, ist ABCA3 möglicherweise durch Bereitstellung von Phospholipiden für die Bildung der Membran von Milchfetttröpfchen an der Milchbildung beteiligt.

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Holzinger danken, dass er mir dieses Thema anvertraut hat. Er hat mich zu jeder Zeit mit thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen zielführend unterstützt.

Besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. Markus Hammel, der mir im Labor stets zur Seite stand. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Rashmi Mittal bedanken, die sich unermüdlich mit meinem Thema beschäftigt hat und mit Ihren Ratschlägen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank an Prof. Schmitz und die Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe für die Phospholipidanalyse der Milch.

Ebenso gilt mein Dank meinen ehemaligen Kommilitonen und den Mitarbeitern der gesamten Forschungseinrichtung des Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und der ZVH für das gute Arbeitsklima und anregende Forschungsumfeld.

Insbesondere bedanke ich mich bei meiner Familie, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung mir das Medizinstudium und diese Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand